

Aus der Klinik für Neurologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Lars Timmermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Auswirkung der Durchtrennung des medialen
Tractus perforans auf die Epileptogenese
im Tractus-perforans-Stimulations-Modell der
Temporallappenepilepsie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin Meyer aus Düsseldorf

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 18.04.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. F. Rosenow

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Becker

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver
der Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Gewidmet meinen Eltern
Gabriele und Hans-Peter Meyer

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	- 3 -
2	<i>Abstract</i>	- 6 -
3	<i>Zusammenfassung</i>	- 7 -
4	<i>Einleitung und theoretischer Hintergrund</i>	- 8 -
4.1	Epilepsie	- 8 -
4.1.1	Epidemiologie	- 8 -
4.1.2	Mortalität und Morbidität von Epilepsiepatienten	- 8 -
4.1.3	Pharmakoresistente Epilepsie	- 9 -
4.1.4	Temporallappenepilepsie	- 10 -
4.1.5	Temporallappenepilepsie mit Hippocampussklerose	- 11 -
4.1.6	Zusammenfassung: Epilepsie	- 11 -
4.2	Anatomischer Aufbau des Hippocampus und des entorhinalen Cortex	- 12 -
4.2.1	Wichtige Faserverbindungen des Hippocampus	- 13 -
4.2.2	Der Gyrus dentatus als Torwächter des Hippocampus	- 15 -
4.3	Pathologie der Temporallappenepilepsie	- 16 -
4.3.1	Hippocampussklerose	- 16 -
4.3.2	Veränderungen des entorhinalen Cortex	- 16 -
4.3.3	Veränderungen in Tiermodellen der Temporallappenepilepsie	- 17 -
4.4	Ätiologie der Temporallappenepilepsie / Epileptogenese	- 18 -
4.4.1	Ätiologie der Temporallappenepilepsie	- 18 -
4.4.2	Epileptogenese	- 18 -
4.5	Tiermodelle der Temporallappenepilepsie	- 19 -
4.5.1	Vergleich verschiedener Tiermodelle	- 19 -
4.5.2	Post-SE-Tiermodelle	- 20 -
4.5.3	Tiermodelle mit nicht-convulsivem Status epilepticus	- 20 -
4.6	„Kindling“	- 21 -
4.7	Sloviters Konzept der Epileptogenese	- 22 -
5	<i>Hypothesen und Fragestellung</i>	- 24 -
6	<i>Materialien und Methoden</i>	- 27 -
6.1	Zeitlicher Ablauf des Experimentes	- 27 -
6.2	Behandlung der Versuchstiere	- 27 -
6.3	Implantation der Elektroden	- 28 -
6.3.1	Narkoseeinleitung / Präoperative Vorbereitung	- 28 -
6.3.2	Befestigung im Stereotaxierahmen	- 28 -
6.3.3	Präparation der Schädeldecke	- 28 -
6.3.4	Positionierung der Elektroden	- 30 -
6.3.5	Fixierung der Elektroden / Modellierung der „Elektrodenkappen“	- 32 -
6.3.6	Postoperatives Vorgehen	- 33 -
6.4	Tractus perforans Stimulationen	- 34 -

6.4.1	30 min Stimulationen	- 34 -
6.4.2	8h Stimulation	- 35 -
6.5	Tractus perforans Durchtrennung	- 36 -
6.5.1	Implantation der Ableitungselektroden II	- 36 -
6.5.2	Methode und Lokalisation der Tractus perforans Durchtrennung	- 36 -
6.5.3	Tractus perforans Durchtrennung (Versuchsgruppe)	- 37 -
6.5.4	Scheinbare Durchtrennung (Kontrollgruppe)	- 37 -
6.5.5	Modellierung der Elektrodenkappe und postoperatives Vorgehen	- 38 -
6.6	Beobachtung der Versuchstiere	- 38 -
6.6.1	Elektroenzephalographische-Beobachtung	- 39 -
6.6.2	Videobeobachtung	- 39 -
6.6.3	Analyse der Daten	- 40 -
6.7	Perfusionsfixierung und Aufarbeitung des histologischen Gewebes	- 41 -
6.7.1	Perfusionsfixierung	- 41 -
6.7.2	Nissel-Färbung	- 42 -
6.7.3	NeuN Immunhistochemie	- 43 -
6.8	Messung der Hippocampusfläche	- 44 -
6.9	Neuronenzählungen	- 46 -
6.10	Verifizierung der Tractus perforans Durchtrennung	- 49 -
6.11	Statistische Analyse	- 50 -
6.12	Verwendete Geräte, Substanzen und Software	- 51 -
7	Ergebnisse	- 53 -
7.1	Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilungen	- 53 -
7.2	Verifizierung der Tractus perforans Durchtrennung	- 54 -
7.2.1	Elektrophysiologische Untersuchung	- 54 -
7.2.2	Histologische Analyse der Durchtrennung	- 55 -
7.3	Beobachtung der Versuchstiere	- 56 -
7.3.1	Epileptische Anfälle	- 58 -
7.3.2	Dauer der Latenzzeit	- 59 -
7.3.3	Anfallslänge	- 60 -
7.3.4	Anfallsseminologie	- 62 -
7.3.5	Interiktale Potentiale	- 63 -
7.3.6	Anfallsfrequenz	- 65 -
7.4	Histologische Auswertung	- 65 -
7.4.1	Bestimmung der Hippocampusfläche	- 67 -
7.4.2	Neuronenzählungen	- 70 -
8	Diskussion	- 73 -
8.1	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	- 73 -
8.2	Kritik der verwendeten Methoden und Einordnung unerwarteter Ergebnisse	- 73 -
8.2.1	Tractus perforans Durchtrennung	- 74 -
8.2.2	Versuche von anderen Arbeitsgruppen mit Tractus perforans Durchtrennungen in Epilepsiemodellen	- 75 -
8.2.3	EEG-Beobachtung	- 76 -
8.2.4	Revidierte Betrachtung der histologischen Veränderungen	- 77 -
8.2.5	Neuronenzählung	- 80 -
8.3	Überprüfung der Hypothesen	- 82 -
8.3.1	Hypothese II	- 82 -
8.3.2	Der Ursprungsort epileptiformer Potentiale und epileptischer Anfälle	- 83 -

8.3.3	Hypothese I	- 84 -
8.3.4	Die Rolle von „interiktalen“ Potentialen während der Epileptogenese	- 84 -
8.3.5	Das Kindling-Phänomen als Mechanismus der Epileptogenese?	- 86 -
8.4	Kernaussage und Ausblick	- 87 -
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	- 89 -
10	<i>Anhang</i>	- 105 -
10.1	Abkürzungsverzeichnis	- 105 -
10.2	Abbildungsverzeichnis	- 106 -
10.3	Tabellenverzeichnis	- 107 -
10.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	- 107 -
10.5	Danksagung	- 108 -
10.6	Publikationsliste	- 109 -

2 Abstract

Purpose: Following stimulation of the main input to the hippocampus, the perforant pathway, in awake rats for 8 h, a seizure-free “latent period” is observed that lasts around three weeks. Continuous recording during the latent period from the dentate gyrus revealed spontaneous events that resembled low-frequency perforant pathway stimulation (PPS). This led us to hypothesize that, during the latent period, input from the entorhinal cortex kindles the hippocampus, eventually culminating in epilepsy. We sought to test this hypothesis by removing entorhinal cortex input to the hippocampus immediately after pro-epileptogenic PPS.

Method: Male Sprague-Dawley rats received bilateral PPS lasting 8 h, which induces temporal lobe epilepsy and classic hippocampal sclerosis. Immediately after PPS, bilateral mechanical transection of the perforant pathway was performed with a microknife. Recording electrodes were re-implanted in the dentate gyrus and animals were continuously video-EEG monitored for spontaneous seizures, beginning two weeks after PPS. Longterm neuropathology was examined histologically starting seventy days after PPS. Controls were treated identically, but received sham surgery (skull trephination, no microknife insertion, recording electrode reimplantation, video-EEG monitoring).

Results: Bilateral angular bundle transection did not alter either epileptogenesis, e.g. the latency to epilepsy, or hippocampal neuropathology.

Conclusion: These data demonstrate that removing entorhinal cortex input to the hippocampus is not an effective antiepileptogenic treatment. Furthermore, this does not support the hypothesis that the entorhinal cortex is an epileptogenic zone that kindles the hippocampus during the latent period.

3 Zusammenfassung

Fragestellung: Im nicht-convulsiven-Tractus-perforans-Stimulation (NKTPS)-Tiermodell kann über einen Zeitraum von 3 Wochen nach der 8h langen Stimulation der Hauptefferenz zum Hippocampus, des Tractus perforans (TP), eine „Latenzzeit“ ohne das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle beobachtet werden. Während der „Latenzzeit“ wurden, durch die kontinuierliche Ableitung der elektrischen Körnerzellaktivität, spontane paroxysmal auftretende Potentiale erfasst. Diese entsprachen den durch eine niederfrequente Tractus-perforans-Stimulation evozierten Körnerzellpotentialen. Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, dass während der Latenzzeit im entorhinalen Cortex (EC) entstehende Entladungen zu einem „kindling“ des Hippocampus führen, was eventuell in der Induktion einer Epilepsie gipfelt. Diese Hypothese wurde überprüft, indem eine bilaterale TP-Transsektion unmittelbar nach der Epilepsie induzierenden Tractus-perforans-Stimulation durchgeführt wurde. Hierdurch wurde die Hauptefferenz vom EC zum Hippocampus unterbunden.

Methode: Männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten eine bilaterale TPS über 8h, was die Entstehung einer Temporallappenepilepsie und eine klassische Hippocampusklerose induziert. Unmittelbar nach der TPS wurde der Tractus perforans beidseitig mit einem Mikromesser durchtrennt. Anschließend wurden in der Körnerzellschicht liegende Tiefenelektroden reimplantiert. Die kontinuierliche Video-EEG Beobachtung der Versuchstiere wurde 2 Wochen nach der letzten Stimulation begonnen. Die chronischen neuropathologischen Veränderungen wurden histologisch frühestens 70 Tage nach der TPS analysiert. Die Kontrolltiere wurden identisch behandelt, erhielten aber nur eine scheinbare Durchtrennung des TP (Trepanation der Schädeldecke, kein Einsatz des Mikromessers, Implantation der Tiefenelektroden).

Ergebnisse: Die beidseitige Durchtrennung des Tractus perforans hatte weder messbare Auswirkungen auf die Epileptogenese, noch auf die hippocampale Neuropathologie.

Schlussfolgerung: Diese Daten belegen, dass die Unterbindung des Hauptzustroms vom entorhinalen Cortex zum Hippocampus keine effektive antiepileptogene Therapie ist. Außerdem wird die Hypothese, dass der entorhinale Cortex eine epileptogene Zone ist, die den Hippocampus während der Latenzzeit „kindled“, nicht gestützt.

4 Einleitung und theoretischer Hintergrund

4.1 Epilepsie

Die Epilepsie ist eine chronische neurologische Erkrankung, welche im aktuellen Report der International League Against Epilepsy (ILAE; (Fisher et al. 2014, S. 477) definiert wird durch:

1. das Auftreten von mindestens zwei unprovzierten epileptischen Anfällen im Abstand von über 24h
2. und / oder das Auftreten eines unprovzierten Anfalls mit einer Auftrittswahrscheinlichkeit von weiteren epileptischen Anfällen die mindestens 60% beträgt
3. und / oder die Diagnose eines Epilepsiesyndroms.

Ein epileptischer Anfall wird als transientes Auftreten von Symptomen beschrieben, die durch eine erhöhte oder anormal synchrone neuronale Aktivität des Gehirns verursacht werden (Fisher et al. 2005, S. 471).

4.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2010 gaben in einer in den USA durchgeführten Umfrage 1,8% der Bevölkerung an, dass bei ihnen die Diagnose einer Epilepsie gestellt wurde. Insgesamt war die Epilepsie in dieser Umfrage die viert häufigste neurologische Erkrankung in den USA, noch vor der Multiplen Sklerose und des Morbus Parkinson (CDC 2012). In Europa besteht in epidemiologischen Studien mit Tür-zu-Tür-Umfragen sowie bei der Auswertung medizinischer Daten eine im Vergleich zu den USA deutlich niedrigere Epilepsie-Prävalenz von 3-6/1000 (Banerjee et al. 2009, S. 35). Die durch Epilepsie verursachte Krankheitslast ist in Entwicklungsländern, trotz höherer Dunkelziffer, deutlich höher als in Industriestaaten (Newton und Garcia 2012). So beträgt die Lebenszeitprävalenz einer Epilepsie in Industriestaaten 5.8 /1000, in urbanen Zentren von Entwicklungsländern 10.3 / 1000 und in den dortigen ländlichen Gebieten sogar 15.4 / 1000 (Ngugi et al. 2010, S. 883). Insgesamt leben laut Angaben der World Health Organisation (WHO) weltweit etwa 50 Millionen Menschen mit Epilepsie, davon 80% in Entwicklungsländern (WHO 2015).

4.1.2 Mortalität und Morbidität von Epilepsiepatienten

Epilepsiepatienten weisen im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung eine dreifach

erhöhte Mortalität auf (Nevalainen et al. 2014, S. 1971). Hierbei ist die Mortalitätsrate bei Patienten mit symptomatischer Epilepsie deutlich höher als bei Patienten mit idiopathischer Epilepsie (Nevalainen et al. 2014, S. 1971). In einer prospektiven Kohortenstudie, bei der 245 Kinder mit Epilepsie über einen Zeitraum von 40 Jahren beobachtet wurden, starben 48% der Probanden, die in diesem Zeitraum keine dauerhafte (≥ 5 Jahre) Anfallsfreiheit erreichten. Eine dauerhafte Anfallsfreiheit war in dieser Studie der einzige Prädiktor für ein längeres Überleben (Sillanpaa und Shinnar 2010). Die Haupttodesursachen von Patienten mit Epilepsie sind nicht-zerebrale-Malignome, kardiovaskuläre Erkrankungen, Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) und Unfälle (Laxer et al. 2014, S. 61). Die Todesursachen unterscheiden sich also nicht gravierend von denen der Durchschnittsbevölkerung. Allerdings versterben 7% der Patienten an direkten Komplikationen der Epilepsie, wie dem sudden unexpected death of epilepsy patients (SUDEP), oder an den Folgen eines Status epilepticus (SE; Trinka et al. 2013; Laxer et al. 2014). Zudem ist die unfallbedingte Mortalität bei einer Epilepsie um das sechsfache und die Suizidrate um das dreifache erhöht, sodass 9-16% Prozent der Epilepsiepatienten an externalen Ursachen versterben (Fazel et al. 2013; Trinka et al. 2013; Laxer et al. 2014).

Die Lebensqualität ist bei Epilepsiepatienten durch die Anfälle selbst, durch Stigmatisierung und Ausgrenzung aus dem gesellschaftlichen Leben (WHO 2015) und durch die häufige Komorbidität mit psychiatrischen Erkrankungen reduziert. So beträgt die Lebenszeitprävalenz einer Depression bei Epilepsiepatienten 13-20% (Fiest et al. 2013) und ist somit drei- bis fünfmal höher als in der Durchschnittsbevölkerung (Strine et al. 2005; Fiest et al. 2013; Verrotti et al. 2014). Die gravierenden Auswirkungen einer Depression bei Epilepsiepatienten wird durch ein auf das zwanzigfache der Durchschnittsbevölkerung erhöhtes Suizidrisiko verdeutlicht (Fazel et al. 2013).

4.1.3 Pharmakoresistente Epilepsie

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse, dass die Mortalität bei Epilepsiepatienten hauptsächlich durch eine dauerhafte Anfallsfreiheit reduziert werden kann (Sillanpaa und Shinnar 2010) und sich die SUDEP Inzidenz bei Patienten mit refraktärer Epilepsie von 1/1000 auf 7/1000 erhöht (Laxer et al. 2014, S. 61), erfolgt eine gesonderte Betrachtung der Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie (PE). Eine PE liegt vor, wenn durch zwei adäquate und ausreichend dosierte antiepileptische Medikamente keine Anfallsfreiheit (Dauer: >3 Intervalle zwischen zwei Anfällen, oder >1

Jahr) erreicht werden kann (Kwan et al. 2010, S. 1073). Etwa 20% der Epilepsiepatienten erfüllen dauerhaft die Kriterien für eine PE (Picot et al. 2008; Del Felice et al. 2010, S. 39), zusätzlich kommt es bei 10% der Epilepsiepatienten erst fünf bis zehn Jahre nach Krankheitsbeginn zu einer Remission (Picot et al. 2008). Eine Eskalation der konservativen Therapie ist bei PE meist erfolglos, so kommt es bei maximal 8% der Patienten unter konservativer Therapie zu einer Remission (Wiebe et al. 2001). Für Patienten mit PE stellt daher ein epilepsiechirurgischer Eingriff die Methode der Wahl dar, um eine dauerhafte Anfallsfreiheit zu erreichen. Durch epilepsiechirurgische Eingriffe wird bei 34-74% der Patienten eine dauerhafte Anfallsfreiheit erreicht (Jobst und Cascino 2015).

4.1.4 Temporallappenepilepsie

Die Temporallappenepilepsie (TLE) ist nach der neuen ILAE-Terminologie (Berg et al. 2010) eine typische Konstellation von elektrophysiologischen und klinischen Befunden. Es handelt sich um eine Epilepsieform mit struktureller Ätiologie. Bei Patienten mit TLE kommt es typischerweise zu fokalen Anfällen welche mit einer epigastrischen Aura beginnen und denen orale oder manuelle Automatismen folgen (Wieser 2004, S. 699). Ebenfalls typisch sind dyskognitive Anfälle, die sich teilweise zu bilateral konvulsiven Anfällen entwickeln (Wieser 2004, S. 699). Elektroenzephalografisch können interiktale „Sharp-waves“ mit maximaler Ausprägung in den sphenoidalen oder den frontotemporalen Elektroden beobachtet werden (Wieser 2004, S. 699). Iktal kann elektroenzephalografisch eine am betroffenen Temporallappen beginnende rhythmische Anfallsaktivität abgeleitet werden (Wieser 2004, S. 699). Es können bei einer TLE aber auch andere Anfallsseminologien auftreten und die typischen Anfallsseminologien sowie die typischen Zeichen im Oberflächen-EEG können fehlen (Wieser 2004).

Aufgrund der teilweise nur unter erheblichen Aufwand möglichen Ermittlung der genauen Ätiologie einer Epilepsie erfolgt diese bei Patienten mit pharmakosensibler Epilepsie nur selten. So gibt es wenige valide epidemiologische Daten über den Anteil der Patienten mit TLE an allen Epilepsiepatienten (Blumcke et al. 2013, S. 1316). In einer Studie an Patienten mit einer im häuslichen Umfeld neu diagnostizierten Epilepsie wurde der Anfallsursprung bei 27% der Patienten mit einem klinisch lokalisierbaren Ursprung im Temporallappen lokalisiert (Manford et al. 1992a, 1992b; Tellez-Zenteno und Hernandez-Ronquillo 2012). Somit scheint die TLE nicht die

insgesamt häufigste Epilepsieform zu sein. Allerdings erhöht sich der Anteil der TLE an den Epilepsien erheblich, wenn Patienten in tertiären Epilepsiezentren untersucht werden. Patienten in einem Epilepsiezentrum in Paris wiesen zu 66% einen Anfallsursprung im Temporallappen auf (Semah et al. 1998; Tellez-Zenteno und Hernandez-Ronquillo 2012), hierbei hatten 80% der Patienten mit temporalem Anfallsursprung eine PE (Semah et al. 1998). Der hohe Anteil der Patienten mit TLE an den Patienten mit PE wird auch dadurch verdeutlicht, dass bei epilepsiechirurgischen Eingriffen in 69-73% der Fälle Temporallappenresektionen durchgeführt werden (Tellez-Zenteno und Hernandez-Ronquillo 2012, S. 3).

4.1.5 Temporallappenepilepsie mit Hippocampussklerose

48% der Patienten mit pharmakoresistenter TLE, bei denen eine Temporallappenresektion durchgeführt wurde, weisen histologisch eine Hippocampussklerose (HS) auf (Coras und Blumcke 2015, S. 2). Bei magnetresonanztomographischen (MRT) Untersuchungen in einem Epilepsiezentrum wiesen 47% der Patienten mit TLE eine HS auf, zudem waren die Patienten mit TLE und HS signifikant häufiger pharmakoresistent als die Patienten mit TLE ohne HS (Semah et al. 1998). Somit weist etwa die Hälfte der Patienten mit TLE eine HS auf und eine HS scheint zusätzlich mit einem schlechteren Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie assoziiert zu sein (Schmidt und Loscher 2005; Blumcke et al. 2013).

4.1.6 Zusammenfassung: Epilepsie

Die Epilepsie ist eine häufige Erkrankung des Gehirns, die einen erheblichen Einfluss auf Lebensqualität und Lebenserwartung der erkrankten Patienten aufweist. Der für die Prognose von Epilepsiepatienten entscheidende Faktor ist das dauerhafte Ansprechen auf eine pharmakologische Therapie. Bei Patienten mit dauerhafter PE besteht häufig eine TLE mit HS, daher ist die Erforschung dieser Epilepsie-Konstellation von besonderem wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Interesse. Hierbei stellt neben einer Optimierung bisheriger Therapieformen und der Entwicklung neuer Therapieansätze auch die Prävention der TLE mit HS ein wichtiges Forschungsfeld dar (NINDS 2013).

4.2 Anatomischer Aufbau des Hippocampus und des entorhinalen Cortex

Um die histologischen Veränderungen sowie das pathophysiologische Zusammenspiel der einzelnen Teilregionen des Temporallappens bei Tieren und Menschen mit TLE zu verdeutlichen, erfolgt nun eine kurze Darstellung der anatomischen Verhältnisse.

Der anatomische Begriff Hippocampus wurde 1587 von Julius Caesar Arantius geprägt, den die Form des Hippocampus an ein Seepferdchen erinnerte (Lewis 1923; Coras und Blumcke 2015, S. 1). Die Hippocampusformation ist Teil des dreischichtigen Allocortex und befindet sich im Temporallappen am Boden des Unterhorns der Seitenventrikel (Schünke et al. 2015). Der Hippocampus ist in drei Teile aufgeteilt: den Gyrus dentatus (GD); das 1742 von de Garengoet nach dem ägyptischen Gott Ammun Kneph benannte Cornu ammonis (CA; (Lewis 1923; Coras und Blumcke 2015, S. 1) und das Subiculum (Sub). Das CA wird entsprechend seiner Lage in der Hippocampusformation wiederum in drei Teile aufgeteilt (Lorente de Nó 1934; Coras und Blumcke 2015; Abbildung 1). Die Teilgebiete des Hippocampus werden in drei Schichten gegliedert. Die tiefste Schicht weist eine hohe Anzahl an Fasern und Interneuronen auf, im GD wird sie Hilus genannt. Die mittlere Schicht ist sehr zell dicht und beinhaltet die Hauptzellen, im DG wird sie Körnerzellschicht, im CA Pyramidenzellschicht genannt. Die oberflächlichste Schicht beinhaltet die Dendriten der Hauptzellen und ist sehr zellarm. Sie wird als Stratum moleculare bezeichnet (van Strien et al. 2009; Abbildung 1)

Der entorhinale Cortex (EC) wird dem parahippocampalen Cortex zugeordnet und gehört ebenfalls zum Allocortex, weist aber wie der Neocortex einen sechsschichtigen Aufbau auf (van Strien et al. 2009; Vismer et al. 2015). Er wird in den kaudaler liegenden medialen entorhinalen Cortex (MEC) und in einen rostraler liegenden lateralen entorhinalen Cortex (LEC) unterteilt (Vismer et al. 2015; Abbildung 1).

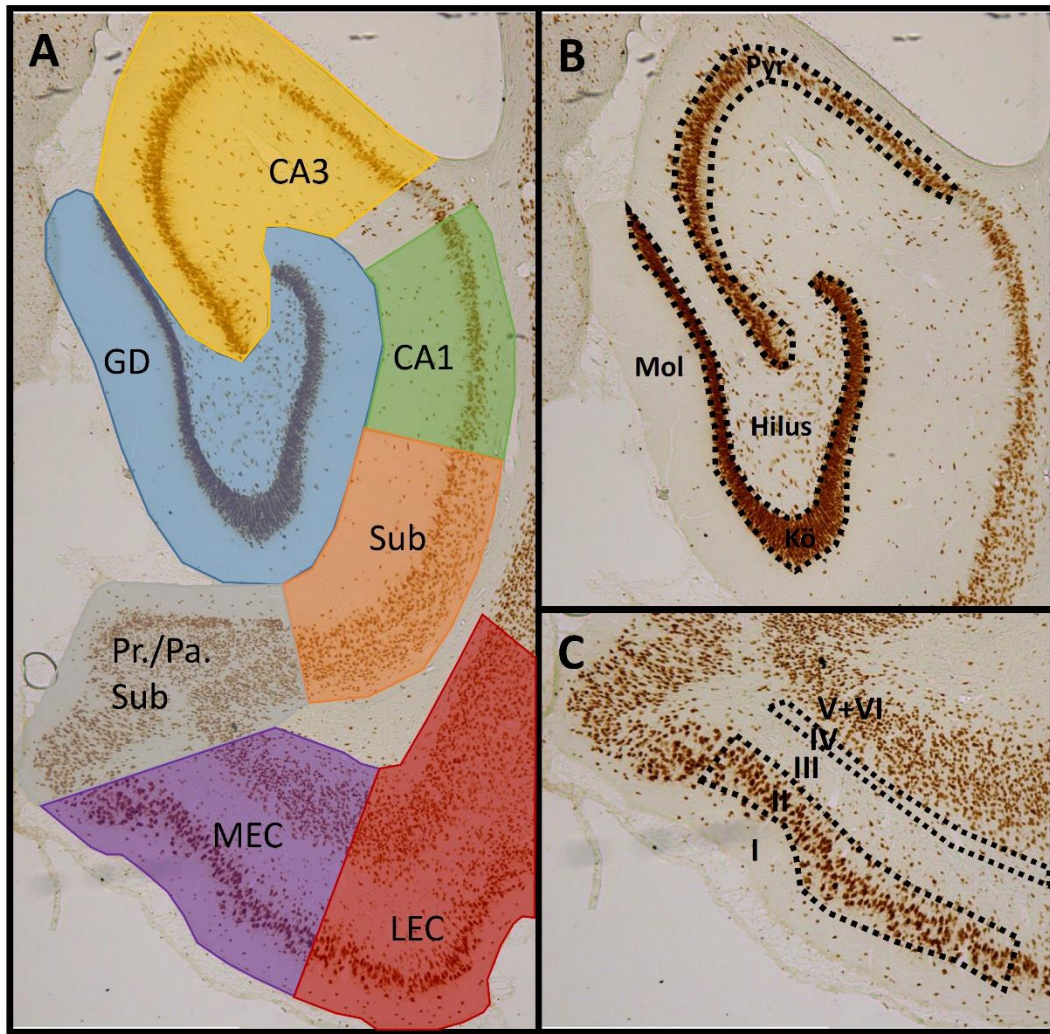


Abbildung 1: Anatomie des Hippocampus und der parahippocampalen Region.

In fünffacher Vergrößerung abgebildeter, mit NeuN immunhistochemisch gefärbter, transversaler Schnitt des rechten Hippocampus von Versuchstier Nr. 25 (Kontrollgruppe). A: Darstellung des Hippocampus und der angrenzenden parahippocampalen Region mit farblicher Markierung der einzelnen Teilgebiete. Abkürzungen: GD=Gyrus dentatus; CA= Cornu ammonis; Sub= Subiculum; Pr. Sub=Praesubiculum; Pa. Sub=Parasubiculum; MEC=medialer entorhinaler Cortex; LEC= lateraler entorhinaler Cortex. B: Darstellung des Hippocampus mit Markierung der einzelnen Schichten. Die zellichte Pyramiden- / Körnerzellschicht befindet sich innerhalb der gestrichelten Linie. Abkürzungen: Mol= Stratum moleculare Kö=Körnerzellschicht; Pyr=Pyramidenzellschicht. C: Darstellung des EC mit Markierung der einzelnen Schichten. Die zellreiche Lamina II sowie die zellarme Lamina IV befinden sich innerhalb der gestrichelten Linien. [Eigene Abbildung; Die Einteilung in Regionen und Schichten erfolgte entsprechend der Abbildungen des Manuskriptes von van Strien et al.(van Strien et al. 2009)].

4.2.1 Wichtige Faserverbindungen des Hippocampus

Der Hippocampus und der EC sind hochgradig miteinander verknüpft (van Strien et al. 2009; Bernhardt et al. 2015, S. 5; Abbildung 2) und bilden ein Netzwerk, dessen Integrität essenziell für höhere kortikale Funktionen wie die räumliche Orientierung ist (Sargolini et al. 2006; Lu et al. 2013; Moser et al. 2014). Die kortikalen Afferenzen des Hippocampus werden hauptsächlich über den EC geleitet (Insausti et al. 1987;

Vismer et al. 2015). Hierbei erfüllt der EC eine ähnliche Funktion wie ein Hub in einem Computernetzwerk, indem er eingehende Informationen sammelt und filtert (Sargolini et al. 2006, S. 758; van Strien et al. 2009).

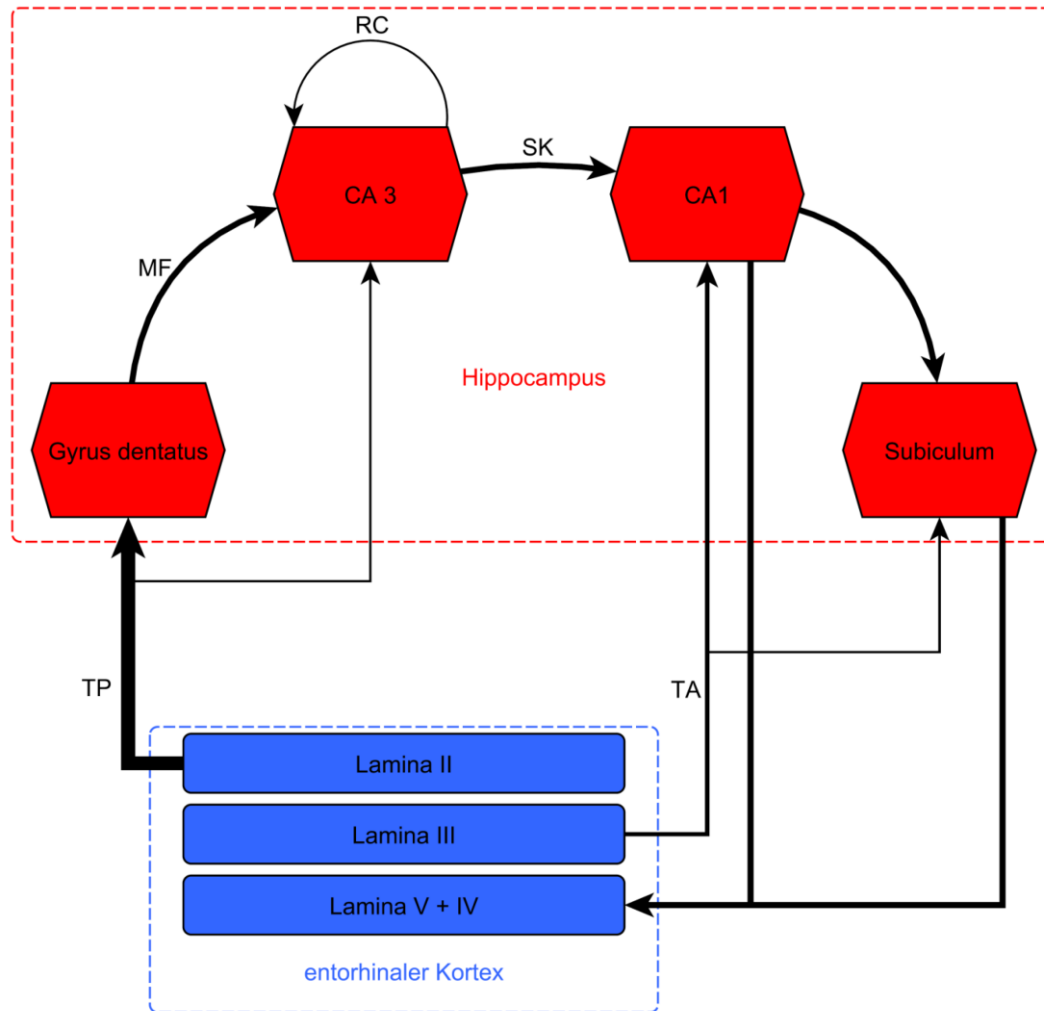


Abbildung 2: Das klassische Hippocampal-Parahippocampale-Netzwerk

Die Hauptafferenz des Hippocampus erreicht die Körnerzellen des GD über den Tractus perforans (TP). Die auch als Moosfasern (MF) benannten Axone der Körnerzellen innervieren die Pyramidenzellen von CA3. Zwischen den Pyramidenzellen bestehen rekurrenzierende Verbindungen (RC), sodass diese untereinander ein zusätzliches assoziatives Netzwerk bilden (Ishizuka et al. 1990). Die Pyramidenzellen von CA3 sind mit den Pyramidenzellen von CA1 über die Schaffer-Kollaterale (SK) verbunden. Zusätzlich besteht mit der temporoammonischen Bahn (TA) eine zweite efferente Verbindung zwischen EC und Hippocampus. Diese Bahn zieht von den Pyramidenzellen der Lamina III des EC ausgehend zu den Pyramidenzellen des CA1 und des Subiculus (Steward und Scoville 1976). [Eigene Abbildung; Die wichtigsten Faserbahnen werden entsprechend folgender Quellen benannt: (van Strien et al. 2009; Goldberg und Coulter 2013; Witter et al. 2014)]

Die größte Faserbahn, welche den EC mit dem Hippocampus verbindet, verläuft von den Sternzellen der Lamina II des EC zu den Körnerzellen des GD, sowie in geringerem Ausmaß auch zu den Pyramidenzellen des CA1 und 3 (Ramón y Cajal 1909; Lorente de Nó 1934; van Strien et al. 2009; Witter et al. 2014). Dieser Fasertrakt wird Tractus perforans (TP) genannt, da er die Eigenschaft hat, alle Schichten des Subiculus zu perforieren (Ramón y Cajal 1909; Andersen et al. 1966; Hjorth-Simonsen und Jeune 1972; Woodhams und Atkinson 1996; Abbildung 3). Die Fasern dieses Traktes bilden 80% der Synapsen in den äußeren 2/3 der Molekularschicht des GD (Matthews et al. 1976). Der TP beinhaltet somit die Mehrzahl der Afferenzen des GD.

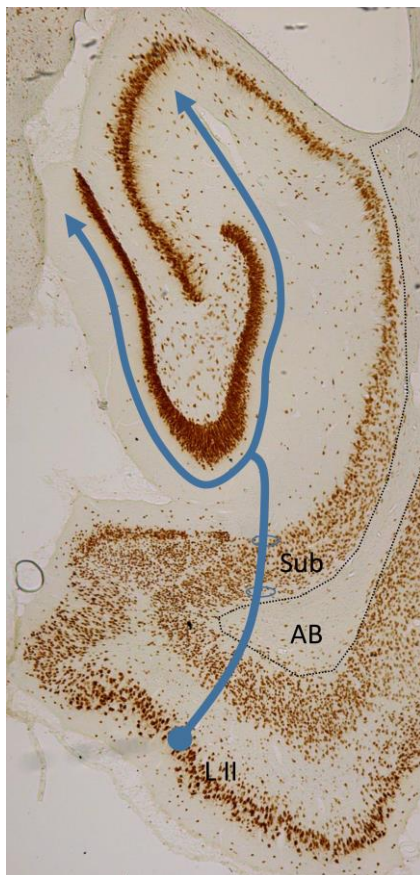


Abbildung 3: Verlauf des Tractus perforans.

In fünffacher Vergrößerung abgebildeter, mit NeuN immunhistochemisch gefärbter transversaler Schnitt des rechten Hippocampus von Versuchstier Nr. 25 (Kontrollgruppe). Die Axone der Sternzellen der Lamina II (L II) des EC verlaufen durch die tieferen Schichten des EC in das Angular Bundle (AB). Vom AB ausgehend perforieren die Fasern des TP das (Prä- / Para-) Subiculum (Sub). Anschließend folgen die Fasern oberflächlich dem Verlauf der Molekularschicht des GD und innervieren dort unter anderem die Dendriten der Körnerzellen (Hjorth-Simonsen und Jeune 1972). [Eigene Abbildung; Die Einzeichnung des TP erfolgte entsprechend folgender Quellen: (Hjorth-Simonsen und Jeune 1972; Woodhams und Atkinson 1996)].

4.2.2 Der Gyrus dentatus als Torwächter des Hippocampus

Die meisten Afferenzen erreichen den Hippocampus über den GD. Dieser dient physiologisch als „Torwächter“ des Hippocampus, indem er nur einen geringen Anteil der eingehenden Informationen an die leichter erregbaren und verletzlicheren Pyramidenzellen des CA3 weiterleitet (Heinemann et al. 1992; Lothman et al. 1992; Coulter und Carlson 2007; Goldberg und Coulter 2013).

4.3 Pathologie der Temporallappenepilepsie

4.3.1 Hippocampussklerose

Der Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen des Hippocampus und dem Auftreten von epileptischen Anfällen wurde bereits 1880 von W. Sommer beobachtet (Sommer 1880). Diese als Hippocampussklerose (HS) benannten pathologischen Veränderungen treten bei einem Teil der Patienten mit chronischer Temporallappenepilepsie auf und werden beim Menschen derzeit in vier Unterformen eingeteilt (Blumcke et al. 2007; Blumcke et al. 2013):

- **ILAE Typ I HS:** 60-80% aller Patienten mit TLE und HS; ausgeprägter Neuronenverlust in CA1 [Verlust von >80% der Pyramidenzellen (Blumcke et al. 2012)], in CA3 (Verlust von 30-90% der Pyramidenzellen), im Hilus (CA4) (Verlust von 40-90% der Neuronen) und weniger ausgeprägt in CA2 (Verlust von 30-50% der Pyramidenzellen); zudem kommt es zu einem Verlust von 50-60% der Körnerzellen.
- **ILAE Typ II HS:** Etwa 5-10% der Patienten mit TLE und HS; Verlust von >80% der Pyramidenzellen in CA1 bei mildem Verlust in den anderen Regionen des Hippocampus.
- **ILAE Typ III HS:** 4-7.4% aller Patienten mit TLE und HS; Verlust von 50% der Neuronen im Hilus, sowie mäßig ausgeprägter Verlust von Körnerzellen; die Zellen des CA sind kaum betroffen; diese Form wird auch „Endfolium Sclerose“ genannt (Margerison und Corsellis 1966; Blumcke et al. 2013).
- **ILAE Typ no HS:** Bei etwa 20% der Patienten mit nachgewiesenem Anfallsursprung im Temporallappen besteht kein Neuronenverlust, sondern nur eine reaktive Gliose des Hippocampus.

4.3.2 Veränderungen des entorhinalen Cortex

Zusätzlich konnte in MRT-Untersuchungen bei 50-70% der Patienten mit TLE und HS eine Atrophie des ipsilateralen EC nachgewiesen werden (Bernasconi et al. 1999; Bernasconi et al. 2001; Jutila et al. 2001; Bernasconi et al. 2003; Bartolomei et al. 2005, S. 677). Diesen Befunden entsprechend bestand bei histologischen Untersuchungen von Patienten mit TLE ein erhöhter Zellverlust der Lamina III des EC (Du et al. 1993).

4.3.3 Veränderungen in Tiermodellen der Temporallappenepilepsie

In Tierversuchen mit verschiedenen Tiermodellen der TLE können die beim Menschen beobachteten histologischen Veränderungen stellvertretend genauer untersucht werden und zelluläre sowie elektrophysiologische Auswirkungen der TLE erfasst werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gegenüberstellung der elektrophysiologischen und histologischen Veränderungen des EC mit denen des Hippocampus.

Entorhinaler Cortex	Hippocampus
<ul style="list-style-type: none"> • Neuronenverlust in Lamina III des MEC mit Verringerung der Zelldichte um 50-60%. Hierbei kommt es vor allem zum Verlust exzitatorischer Pyramidenzellen (Du et al. 1995; Kobayashi et al. 2003; Drexel et al. 2012). • Reduzierte Hemmung der Sternzellen in Lamina II des EC (Kobayashi et al. 2003) durch Reduktion der Zellzahl der Interneuronen im ganzen EC um ca 80% (Kumar und Buckmaster 2006). • Auftreten spontaner epileptischer Entladungen mit Ursprung im EC (Kobayashi et al. 2003). • Übererregbarkeit der Sternzellen in Lamina II des EC (Scharfman et al. 1998; Kumar und Buckmaster 2006; Pilli et al. 2012) bei reduzierter Hemmung (s.o.) und vermehrter Aktivierung (Pilli et al. 2012). 	<ul style="list-style-type: none"> • Unmittelbarer Verlust / Inaktivierung von Interneuronen im Hilus (Sloviter 1987; Buckmaster und Dudek 1997; Kobayashi und Buckmaster 2003) sowie in CA1 (Best et al. 1993). • Übererregbarkeit der Körnerzellen (Sloviter 1991; Pathak et al. 2007) mit Ausbildung multipler Spikes bei Tractus perforans Stimulation (Shao und Dudek 2011). • Moosfasersprossung (Nadler et al. 1980; Tauck und Nadler 1985), sowie Axonsprossung von Pyramidenzellen in CA3 und von Mooszellen des Hilus (Jinde et al. 2013) mit Ausbildung recurrenter exzitatorischer Erregungskreisläufe. • Beeinträchtigung der „Torwächterfunktion“ des GD mit vermehrter Weiterleitung epileptiformer Aktivität an CA3 (Behr et al. 1998; Pathak et al. 2007; Shao und Dudek 2011). • Verbreiterung der Körnerzellschicht, mit Zerstreuung der einzelnen Körnerzellen (Houser 1990).

4.4 Ätiologie der Temporallappenepilepsie / Epileptogenese

Da eine Epilepsie schwerwiegende Auswirkungen auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten hat und es bei einem Teil der Patienten mit TLE auch nach epilepsiechirurgischen Eingriffen zum unkontrollierten Auftreten epileptischer Anfälle kommt, ist die Primär- und Sekundärprävention der Epilepsie ein wichtiges Thema der aktuellen Forschung (NINDS 2013). Voraussetzung für eine effektive Prävention ist zunächst die vertiefte Forschung über Ursache und Entstehung der TLE.

4.4.1 Ätiologie der Temporallappenepilepsie

Insgesamt besteht nach prolongierten Fieberkrämpfen und Schädelhirntraumata (SHT) ein allgemein erhöhtes Epilepsierisiko (Patterson et al. 2014; Pitkanen und Immonen 2014). Retrospektiv weisen etwa 40% der Patienten mit histologisch gesicherter TLE und HS eine der Erkrankung vorhergehende Verletzung auf (englisch: initial precipitating injurie =IPI; Blumcke et al. 2007, S. 238). Bei 56% der Patienten war die IPI ein prolongierter komplexer Fieberkrampf, bei 22% eine Encephalitis, bei 10% ein SHT, bei 6% ein Geburtstraumata und bei 4,5% eine intracerebrale Blutung (ICB) (Blumcke et al. 2007, S. 238). Ein Teil der Patienten weist bereits kurze Zeit nach der IPI bildmorphologische Veränderungen des Hippocampus, sowie klinisch stumme (= nicht-konvulsive) epileptische Anfälle auf (Vespa et al. 2010; Lewis et al. 2014). Zu klinisch manifesten Anfällen kommt es aber erst durchschnittlich 4-11 Jahre nach der IPI (French et al. 1993; Blumcke et al. 2007; Patterson et al. 2014). Diese klinisch stumme Periode zwischen IPI und Manifestation der Epilepsie wurde bereits 1881 von Gowers beschrieben (Gowers 1881) und wird als Latenzzeit bezeichnet.

4.4.2 Epileptogenese

Die Beobachtung einer Latenzzeit zwischen IPI und Manifestation der Epilepsie führte zu der Annahme, dass sich eine Epilepsie nicht schlagartig entwickelt, sondern die IPI einen langsam verlaufenden Umwandlungsprozess des Nervengewebes auslöst, welcher schlussendlich zur Entstehung epileptischer Anfälle führt (Löscher und Brandt 2010, S. 669). Der Prozess der Umwandlung von gesundem Nervengewebe in dauerhaft Anfälle generierendes Nervengewebe wird Epileptogenese (Epilepsie + Genesis [= altgriechisch für Geburt / Entstehung]) genannt (Livingston et al. 1956; Giblin und Blumenfeld 2010; Löscher und Brandt 2010; Goldberg und Coulter

2013). Während der Epileptogenese kommt es zu Veränderungen von Ionenkanälen und wichtigen Signalwegen der Nervenzellen (Lerche et al. 2011; Lerche et al. 2013; Löscher et al. 2013; Boison 2015), zu epigenetischen Veränderungen (Pitkanen und Lukasiuk 2011; Lerche et al. 2011; Vieira et al. 2016), zu neuroimmunologischen Veränderungen (Vezzani et al. 2011; Xu et al. 2013), zu Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke (Gorter et al. 2015a), zu histologischen Veränderungen (O'Dell et al. 2012) und zur Ausbildung neuer neuronaler Netzwerke (Dichter 2009; Sloviter et al. 2012; Goldberg und Coulter 2013). Obwohl viele mit der Epileptogenese assoziierte Veränderungen des Nervensystems entdeckt wurden und einige antiepileptogene (= die Epileptogenese verhindernde) Maßnahmen in Tiermodellen Erfolge aufwiesen (Radzik et al. 2015), konnte die Epileptogenese in klinischen Studien bisher nicht beeinflusst werden (Trinka und Brigo 2014).

4.5 Tiermodelle der Temporallappenepilepsie

Nur ein geringer Anteil der Menschen, die eine potentiell Epilepsie induzierende Verletzung erleiden, entwickeln im Verlauf eine Epilepsie (Patterson et al. 2014). Zudem beträgt die durchschnittliche Latenzzeit beim Menschen mehrere Jahre. Die Durchführung klinischer Studien zur Epileptogenese ist somit nur unter erheblichem Aufwand möglich, die meisten bisherigen Erkenntnisse über die Epileptogenese stammen daher aus Versuchen mit Tiermodellen der TLE.

4.5.1 Vergleich verschiedener Tiermodelle

Es gibt eine hohe Anzahl verschiedener Tiermodelle der TLE, deren Hauptunterschied die zur Epilepsie-Induktion verwendete Methode ist. Da 90-100 % der Tiere spontane Anfälle entwickeln und die Latenzzeit mit ein bis vier Wochen relativ kurz ist, werden in der aktuellen Forschung am häufigsten Tiermodelle verwendet, bei denen als IPI ein prolongierter SE (Post-SE-Tiermodelle) induziert wird (Löscher und Brandt 2010, S. 692; Gorter et al. 2015b). Obwohl die Ätiologie von Tiermodellen, in denen die Epilepsie durch einen Schlaganfall, ein Hirntrauma oder einen Fieberkrampf induziert wird, eher derjenigen des Menschen entspricht, werden diese Modelle seltener verwendet. Dies ist vor allem dadurch bedingt, dass in diesen Modellen nur 10-50 % der Tiere spontane Anfälle entwickeln und die Latenzzeit oft mehrere Monate beträgt (Löscher und Brandt 2010, S. 692).

4.5.2 Post-SE-Tiermodelle

Aufgrund der geringen Kosten und des niedrigen zeitlichen Aufwandes werden am häufigsten Post-SE-Tiermodelle verwendet, in denen der SE durch Chemokonvulsiva wie Kainat (Ben-Ari und Lagowska 1978) oder Pilocarpin (Turski et al. 1983) induziert wird (Levesque et al. 2015). Als Alternative können Post-SE-Tiermodelle verwendet werden, in denen der SE durch die elektrische Stimulation verschiedener Hirnregionen induziert wird (Lothman et al. 1989). Diese Methode ist etwas aufwändiger als die Induktion eines SE mittels Chemokonvulsiva, weist aber eine geringere periprozedurale Mortalität auf (Bumanglag und Sloviter 2008, S. 565; Levesque et al. 2015). Außerdem kann die Länge des SE und damit das Ausmaß der Epilepsie induzierenden Läsion (EIL) genauer bestimmt werden (Löscher und Brandt 2010, S. 686).

Einige Eigenschaften von Post-SE Tiermodellen verdeutlichen allerdings, dass diese kein valides Modell der menschlichen TLE mit HS sind. So entsteht in Post-SE-Tiermodellen ein ausgeprägter extrahippocampaler Neuronenverlust bei nur mäßiger Atrophie des Hippocampus. Außerdem scheint zumindest ein Teil der aufgezeichneten epileptischen Anfälle extratemporalen Ursprungs zu sein (Harvey und Sloviter 2005; Sloviter et al. 2007; Sloviter 2009; Toyoda et al. 2013). Bei Menschen mit TLE entstehen die epileptischen Anfälle meist im Temporallappen und der Neuronenverlust ist meist auf die (Para-)Hippocampale Region begrenzt.

4.5.3 Tiermodelle mit nicht-konvulsivem Status epilepticus

Um die histologischen Veränderungen der Menschlichen TLE mit HS besser abbilden zu können, wurden Tiermodelle entwickelt, in denen die Epilepsie durch einen nicht-konvulsiven SE induziert wird (Sloviter und Damiano 1981; Norwood et al. 2010). In dem Tiermodell der TLE mit HS, das 2010 von Norwood et al. entwickelt wurde, erhalten die Ratten eine beidseitige Tractus perforans Stimulation (TPS) an drei aufeinander folgenden Tagen (Norwood et al. 2010). An den ersten beiden Tagen kommt es entsprechend dem klassischen Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell (TPS-Tiermodell) zur Ausbildung eines konvulsiven SE, welcher nach dreißig Minuten unterbrochen wird (Gorter et al. 2001). Bei einer SE Dauer von 30 min entstehen weder histologische Veränderungen noch kommt es zu spontanen epileptischen

Anfällen (Lemos und Cavalheiro 1995; Giblin und Blumenfeld 2010). Durch einen antiepileptischen Effekt der beiden 30 min langen Vorstimulationen kommt es bei einer TPS am dritten Tag, trotz Verwendung derselben Stimulationsparameter, nicht zur Ausbildung eines konvulsiven SE. Der nun nicht-konvulsive SE am dritten Tag kann über eine Dauer von 8h aufrechterhalten werden, ohne dass dies zum Tod der Versuchstiere führt. Durchschnittlich drei Wochen nach der TPS über 8h werden bei den Versuchstieren spontane epileptische Anfälle beobachtet (Norwood et al. 2010). Spätestens neun Wochen nach der TPS weisen die Versuchstiere eine HS vom ILAE Typ I mit ausgeprägtem Neuronenverlust in CA1, in CA3 und im Hilus, sowie einer Volumenreduktion des Hippocampus um 80% auf (Norwood et al. 2010; Blumcke et al. 2013). Der extrahippocampale Neuronenverlust ist in diesem Tiermodell mäßig ausgeprägt und hauptsächlich auf den parahippocampalen Kortex beschränkt. Zusammengefasst scheint das von Norwood et al. entwickelte Tiermodell dazu geeignet, valide die bei Patienten mit TLE und HS am häufigsten beobachteten histologischen Veränderungen abzubilden (Löscher und Brandt 2010, S. 692; Gorter et al. 2015b). Da dieses von Norwood et al. entwickelte Tiermodell bisher keinen Eigennamen hat, wird es in dieser Arbeit als „nicht-konvulsives-Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell“ (NKTPS-Tiermodell) benannt.

4.6 „Kindling“

Das bereits 1967 von Goddard entwickelte Kindling-Tiermodell war eines der ersten Tiermodelle der TLE (Goddard 1967). Hierbei werden limbische Gehirnnareale (meist die Amygdala) repetitiv elektrisch stimuliert. Anfangs lösen die Stimulationen kurze epileptiforme Nachladungen aus, führen aber nicht zu einer konvulsiven Reaktion des Versuchstiers. Bei einer repetitiven Wiederholung der elektrischen Stimulation nimmt die Länge der evozierten epileptischen Anfälle progredient zu, die evozierten Anfälle involvieren ein größeres Hirnnareal und führen schlussendlich zu konvulsiven Reaktionen des Versuchstiers (Bertram 2007, S. 66). Der in diesem Tiermodell beobachtete Effekt, dass bei repetitiver elektrischer Induktion eines epileptischen Anfalls die evozierte epileptiforme Reaktion im Verlauf klinisch und elektrographisch stärker ausfällt, wird Kindling-Phänomen (englisch *kindle* = entzünden / anzünden) genannt (Bertram 2007, S. 66; Gorter et al. 2015b). Im Kindling-Tiermodell kommt es erst nach über 300 Stimulationen zu spontanen epileptischen Anfällen (Pinel und Rovner 1978). Zudem werden die typischen histologischen Veränderungen einer HS

nicht ausgebildet (Bertram 2007). Auch aufgrund des erheblichen zeitlichen Aufwandes wird dieses Tiermodell daher zunehmend seltener verwendet (Gorter et al. 2015b).

Obwohl das Kindling-Tiermodell als Modell der TLE mit HS einige Nachteile aufweist, gilt das Kindling-Phänomen als möglicher Mechanismus der Epileptogenese. So wird beim „Kindling“ zwar kein ausgeprägter Neuronenverlust beobachtet, aber nach abgeschlossenem „Kindling“ werden Veränderungen von Ionenkanälen (Blumenfeld et al. 2009; Löscher et al. 2013), Signalmolekülen (Giblin und Blumenfeld 2010) und der Erregbarkeit von Neuronen (Gorter et al. 2015b) beobachtet. Zudem treten histologische Veränderungen wie eine Moosfasersprossung auf (Sutula und Dudek 2007). Einige dieser Veränderungen konnten mit einer erniedrigten Anfallschwelle in Verbindung gebracht werden und sind somit potentiell proepileptogen. Es ist bisher unklar, ob diese Veränderungen nur bei induzierten epileptischen Anfällen auftreten, oder ob sie auch durch spontane epileptische Anfälle erzeugt werden können und somit „epileptische Anfälle weitere Anfälle erzeugen“ (Gowers 1881).

4.7 Slovitors Konzept der Epileptogenese

Sowohl in Tiermodellen, als auch beim Menschen treten nicht-convulsive epileptische Anfälle bereits unmittelbar im Anschluss an die IPI auf (Claassen et al. 2004; Bumanglag und Sloviter 2008; Löscher et al. 2015). Somit scheint die Latenzperiode, definiert man diese als Zeit zwischen IPI und erstem epileptiformen Ereignis, deutlich kürzer zu sein als bisher angenommen. In vivo (Bower und Buckmaster 2008; Bumanglag und Sloviter 2008; Norwood et al. 2010) und in vitro Experimente (Calcagnotto et al. 2000; Stoop und Pralong 2000) lassen vermuten, dass die unmittelbar nach der IPI auftretenden nicht-convulsiven Anfälle innerhalb des EC entstehen und sich über den TP auf den GD ausbreiten. Im EC induziert die IPI einen Untergang hemmender Interneuronen (Kumar und Buckmaster 2006), was zu einer Übererregbarkeit der Sternzellen in Lamina II des EC führt (Kobayashi et al. 2003; Kumar und Buckmaster 2006). Die Sternzellen erzeugen daraufhin spontane epileptiforme Entladungen (Barbarosie und Avoli 1997).

Aufgrund dieser Erkenntnisse konzipierten Sloviter et al. folgende Theorie der Epileptogenese (Sloviter et al. 2012, S. 14):

1. Durch die IPI entsteht ein akut auftretender Neuronenverlust. Dieser Neuronenverlust betrifft im EC und im GD überproportional viele hemmende Interneurone (oder deren Hauptafferenzen, wie die Mooszellen im GD) und führt daher zu einer Übererregbarkeit der Prinzipalzellen. Die resultierende Übererregbarkeit reicht im GD nicht für die Erzeugung spontaner epileptiformer Entladungen aus. Im EC besteht eine größere Übererregbarkeit welche zur Bildung spontaner epileptiformer Entladungen ausreicht. Die epileptiformen Entladungen breiten sich vom EC auf die umliegenden Gehirnstrukturen aus. Die Ausbreitung der epileptiformen Entladungen auf den Hippocampus wird allerdings durch die noch intakte „Torwächter-Funktion“ des GD verhindert, sodass keine konvulsive Reaktion erfolgt. Dieser Prozess wird von Sloviter et al. als eigentliche Epileptogenese bezeichnet.
2. In der klinisch stummen Latenzzeit erfolgt ein Prozess der „Epilepsie-Reifung“. Hierbei induzieren die sich über den TP auf den GD ausbreiten repetitiven nicht-konvulsiven Anfälle einen Kindling-Prozess im GD. Dieser Kindling-Prozess führt dazu, dass der GD seine inhibitorische Torwächterfunktion verliert und die Anfälle sich nun auf den Hippocampus ausbreiten können. Über den Hippocampus breitet sich die Anfallsaktivität auf den motorischen Neocortex aus und die spontanen epileptiformen Entladungen erzeugen eine konvulsive Reaktion.

5 Hypothesen und Fragestellung

In Experimenten mit dem von Norwood et al. entwickelten NKTPS-Tiermodell wurden während der Latenzzeit mit Hilfe von Tiefenelektroden, die in der Körnerzellschicht positioniert wurden, spontane hochamplitudige elektrographische Potenziale aufgezeichnet. Morphologisch imponierten diese spontanen Ereignisse nicht als „fast ripples“ (Bragin et al. 1999), sondern eher als einfache Population Spikes (PS) der Körnerzellen (Andersen et al. 1971). Die Wellenform dieser spontanen Körnerzellpotenziale war identisch mit der Wellenform, welche durch eine niedrig-frequentierte TPS evoziert wird (Abbildung 4). Daher wurden diese spontanen Ereignisse als Körnerzellentladungen interpretiert, welche durch aberrante Efferenzen aus dem EC evoziert werden (Norwood et al. 2010). Ähnliche, während der Latenzzeit auftretende elektrographische Potenziale, wurden auch in anderen Tiermodellen der Temporallappenepilepsie aufgezeichnet (Kobayashi und Buckmaster 2003; Bumanglag und Sloviter 2008). Zudem konnten beim Menschen beobachtete interiktale Potentiale durch eine intraoperative TPS reproduziert werden (Rutecki et al. 1989).

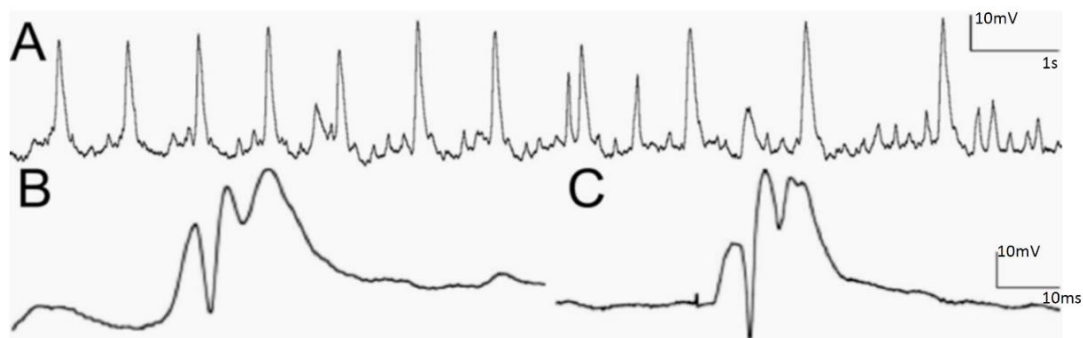


Abbildung 4: Spontane Körnerzellpotenziale

Die Potenziale wurden während der Latenzzeit im NKTPS-Tiermodell mit einer in der Körnerzellschicht des GD lokalisierten Tiefenelektroden aufgezeichnet. **A:** Ein 12s langer Ausschnitt der Körnerzellaktivität in dem spontane hochamplitudige elektrographische Potenziale aufgezeichnet wurden. Die elektrographischen Potentiale treten in diesem Ausschnitt regelmäßig in einer Frequenz von etwa 1Hz auf. **B:** 0.1s langer Ausschnitt aus A in höherer zeitlicher Auflösung. Das spontane Körnerzellpotenzial stellt sich als positive Welle mit einem dieser Welle aufgelagerten negativen Spike dar. Die so dargestellte Wellenform entspricht morphologisch einem exzitatorischem postsynaptischen Potential (EPSP) mit population spike (PS) (Andersen et al. 1971). Ein Körnerzellpotential dieser Morphologie wurde durch Anderson et al. während der TPS abgeleitet (Anderson et al. 1966). **C:** Die abgebildete Wellenform wurde bei derselben Ratte durch eine TPS mit 7.8V evoziert. Die Morphologie der abgebildeten Wellenform entspricht ebenfalls einem EPSP mit PS. Die in C dargestellte, durch eine TPS evozierte Wellenform, ist morphologisch identisch mit dem spontan aufgetretenen Körnerzellpotential in B. Daher postulierten wir, dass die spontan während der Latenzzeit auftretenden Körnerzellpotentiale durch eine Aktivierung der Körnerzellen über den TP evoziert werden. [Eigene Abbildung; ebenfalls verwendet in (Meyer et al. 2016)]

Anhand dieser Beobachtungen und in Bezug auf das Konzept der Epileptogenese von Sloviter et al. (Sloviter et al. 2012) stellten wir folgende erste Hypothese auf:

Bei den in mehreren Tiermodellen beobachteten spontanen elektrographischen Ereignissen handelt es sich um epileptiforme Entladungen, welche im MEC entstehen und sich über den TP auf den Hippocampus ausbreiten. Diese spontanen epileptiformen Entladungen treten unmittelbar nach der IPI auf und erzeugen einen Kindling-Prozess im GD des Hippocampus. Durch diesen Kindling-Prozess werden die electrophysiologischen Eigenschaften des GD so verändert, dass dieser seine inhibitorische Torwächterfunktion verliert und nun die Ausbreitung epileptiformer Entladungen begünstigt. Hierdurch kommt es zu einer „Reifung“ der Epilepsie: Die zu Beginn der Latenzperiode nicht-convulsiven epileptiformen Entladungen lösen nun convulsive Reaktionen aus.

Da spontan auftretende Körnerzellpotentiale im Pilocarpin Tiermodell nach einer Lidocain Injektion in den medialen TP sistierten (Kobayashi und Buckmaster 2003) und ein Messerschnitt im Verlauf des medialen TP im Kindling-Tiermodell das entstehen convulsiver Anfälle verhinderte (Savage et al. 1985), stellten wir folgende zweite Hypothese auf:

Die „Ausreifung“ der Epilepsie ist abhängig von einer intakten Verbindung zwischen MEC und Hippocampus. Die Unterbindung des medialen TP, der Hauptverbindung zwischen MEC und GD, führt zu einem Sistieren der spontanen Körnerzellpotentiale. Hierdurch wird das „Kindling“ des GD verhindert und die „Ausreifung“ der Epilepsie aufgehalten oder stark verlangsamt.

Eine Bestätigung dieser Hypothesen im Tiermodell würde das von Sloviter et al. entwickelte Konzept der Epileptogenese untermauern (Sloviter et al. 2012). Die seit Jahren diskutierte Beteiligung des Kindling-Phänomens an der Epileptogenese (Löscher et al. 2015) wäre in einem Epilepsiemodell mit spontanen epileptischen Anfällen somit nachgewiesen. Außerdem wäre dies der experimentelle Nachweis einer pathophysiologischen Bedeutung kurzer epileptiformer Ereignisse im EEG, welche ebenfalls seit Jahren diskutiert wird (Staley et al. 2011). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse könnte die Entwicklung antiepileptogener Maßnahmen auf solche Substanzen fokussiert werden, die das Kindling-Phänomen beeinflussen (Löscher und Brandt 2010; Löscher et al. 2015) und „interiktale Potentiale“ supprimieren.

Zur Verifizierung dieser Thesen wurde ein Experiment mit folgender Fragestellung durchgeführt:

„Führt die Durchtrennung des medialen Tractus perforans unmittelbar nach der Epilepsie induzierenden Läsion im NKTPS-Tiermodell zu einer Beeinflussung der Epileptogenese und / oder der in diesem Tiermodell resultierenden chronischen histologischen Veränderungen des Hippocampus?“

Bei einem Zutreffen beider Hypothesen wurde erwartet, dass eine Durchtrennung des medialen TP das Auftreten spontaner Körnerzellpotentiale (Hypothese II) und dadurch das „Ausreifen“ der Epilepsie (Hypothese I) verhindert, sodass die Versuchstiere nur kurze, nicht-convulsive Anfälle ausbilden.

6 Materialien und Methoden

6.1 Zeitlicher Ablauf des Experimentes

Der zeitliche Ablauf des Experimentes war bei allen Versuchstieren einheitlich. Am Tag 1 wurden die Hirnelektroden implantiert. Am Tag 7 und 8 wurde eine 30min lange TPS durchgeführt und am Tag 9 eine 8h lange TPS. Am Tag 9, unmittelbar nach Beendigung der TPS, wurde die zweite Operation durchgeführt. Hierbei wurden zunächst neue Ableitungselektroden implantiert. Anschließend erfolgte in der Tractus-perforans-Durchtrennungs-Gruppe (TPD-Gruppe) die beidseitige Durchtrennung des medialen TP. In der Kontrollgruppe wurde eine scheinbare Durchtrennung durchgeführt. Ab dem Tag 23 wurde mit der Überwachung der Versuchstiere begonnen. Ab dem Tag 70 wurden die Tiere perfusionsfixiert, ihre Gehirne entnommen und histologisch untersucht (Abbildung 5).

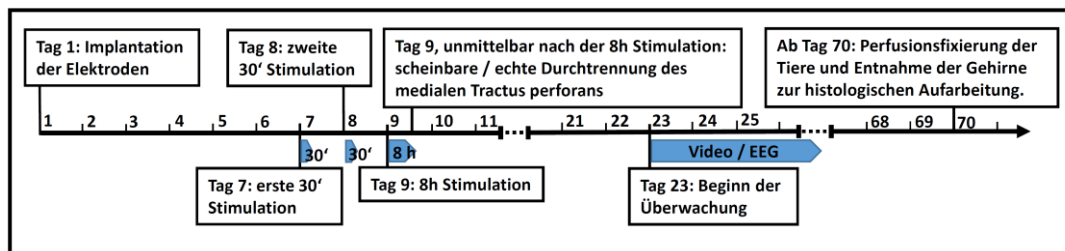


Abbildung 5: Zeitleiste des Versuchsablaufs

6.2 Behandlung der Versuchstiere

Die Versuche wurden an insgesamt 53 männlichen Sprague–Dawley-Ratten durchgeführt. Die Ratten stammten vom Züchter Harlan / Winkelmann aus Borcheln in Deutschland. Da sowohl das Alter (Chung et al. 2015) als auch zyklusabhängige Hormonschwankungen (Tauboll et al. 2015) Auswirkungen auf die Anfallsfrequenz haben, wurden die Versuche ausschließlich an männlichen Tieren im Alter von 10-12 Wochen durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in den Tierhaltungs-Containeranlagen des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg. Der Zustand der Tiere wurde täglich überprüft, hierbei wurde insbesondere auf Anzeichen für Schmerzen geachtet. Die Ratten wurden nach der Implantation der Elektroden (s.u.) einzeln in speziell von der Feinmechanik-Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Marburg gefertigten Plexiglaskäfigen gehalten. Durch die Verwendung von Käfigen mit erhöhter Decke sollte verhindert werden, dass es zu einem vorzeitigen Verlust der „Elektrodenkappen“ (s.u.) kommt. Die Tierhaltung erfolgte in einem klimatisierten

Tierstall bei einer Temperatur von 21-25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 31-47%. Es bestand ein 12h langer Tageszyklus (Tageslicht von 7-19Uhr) und die Tiere hatten während des gesamten Experimentes freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

Die Tierhaltung erfolgte in Übereinstimmung mit der Direktive 2010/63/EU des Parlamentes und Rates der Europäischen Union. Der Versuch wurde nach Einsendung eines Tierversuchsantrages von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießens geprüft und genehmigt. Alle die Versuche betreuenden Personen mit Tierkontakt haben vor Versuchsbeginn ein Felasa B Zertifikat erworben.

6.3 Implantation der Elektroden

Zur Durchführung der TPS erfolgte zunächst die Implantation der Stimulations- und Ableitungselektroden. Die Implantationen wurden entsprechend dem Vorgehen in den bisherigen Studien mit dem NKTPS-Tiermodell (Norwood et al. 2010; Norwood et al. 2011; Will et al. 2013; Vieira et al. 2016) durchgeführt.

6.3.1 Narkoseeinleitung / Präoperative Vorbereitung

Die Implantation der Elektroden erfolgte unter Vollnarkose mit 120 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin intraperitoneal (i.p.) (Ketamin Inresa; Inresa Arzneimittel GmbH) und 5 mg / kgKG Xylazin i.p. (Rompun®; Bayer Vital GmbH). Die Augen der Versuchstiere wurden mit Augensalbe (Bepanthen®; Bayer Vital GmbH) bestrichen, um ein Austrocknen während der Narkose zu verhindern.

6.3.2 Befestigung im Stereotaxierahmen

Nachdem eine ausreichend tiefe Analgosedierung festgestellt wurde, indem die Tiere keine Reaktion auf einen Schmerz - und Druckreiz an ihren Hinterpfoten zeigten, wurde den Ratten der Kopf mit einem elektronischen Rasierer rasiert. Anschließend erfolgte die Befestigung des Kopfes der Versuchstiere im Kopfhalter des Stereotaxierahmens (Modell 900; David Kopf Instruments). Die Verbindungslinie der beiden „Ohrbalken“ entsprach nun der interauralen Linie (Abbildung 6).

6.3.3 Präparation der Schädeldecke

Nach korrekter Fixierung der Ratte im Stereotaxierahmen wurde nun die Schädeldecke freigelegt. Hierzu wurde die Kopfhaut, nach vorheriger sorgfältiger Desinfektion (Kodan®; Schülke), über der Sutura sagittalis mit einem Skalpell (Fine Science Tools GmbH) eingeschnitten. Daraufhin wurde die noch an der Schädeldecke haftende Haut

mit einem Tupfer zur Seite geschoben und mittels gebogenen Arterienklemmen (Baby-Mixer Hemostat – Curved; Fine Science Tools GmbH) an den Seiten fixiert.

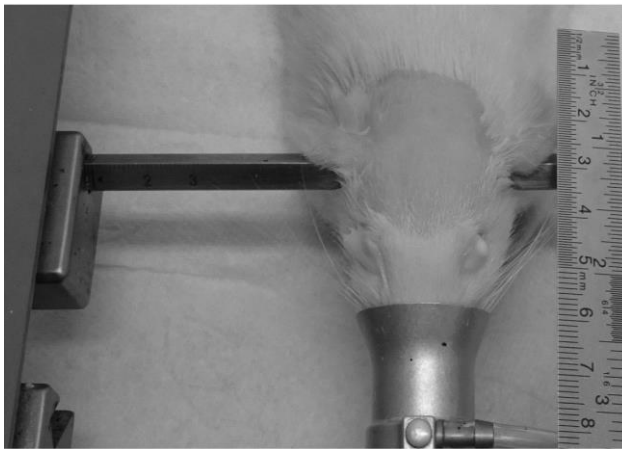


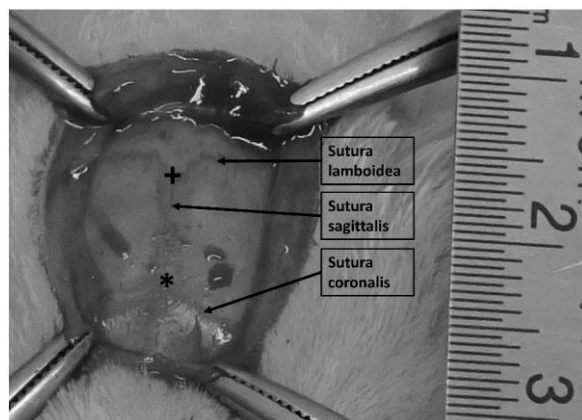
Abbildung 6: Im Stereotaxieramen befestigtes Versuchstier.

Die „Ohrbalken“ und der hier nicht sichtbare „Zahnbalken“ fixieren den Kopf. Die Verbindungslinie der beiden „Ohrbalken“ entspricht der interauralen Linie. [Eigene Abbildung; die Bilder zur Verdeutlichung der Elektrodenimplantation wurden während einer anderen Versuchs aufgenommen, bei dem zum Teil andere Materialien verwendet wurden, so ist in dieser Abbildung eine Atemmaske sichtbar, da die Versuchstiere mit Isofluran anästhesiert wurden. Die Elektrodenimplantation selber erfolgte aber auf dieselbe Weise wie in dem hier beschriebenen Versuch.

Nach einer Säuberung mit Wasserstoffperoxid (30%) stellte sich nun die Schädeldecke mit den Suturæ sagittalis, lamboidea und coronalis, sowie den beiden Suturen-Kreuzungspunkten Bregma und Lambda dar (Abbildung 7).

Abbildung 7: Freipräparierte Schädeldecke

Die Suturæ sind im Bild beschriftet. Das Sternchen (*) markiert den Suturen-Kreuzungspunkt Bregma, das Plus (+) Lambda. [Eigene Abbildung]



Die stereotaktische Orientierung erfolgte nun unter Bezugnahme auf den Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson 2007). Hierbei galten folgende Bezugspunkte (0-Punkte):

anterior / posterior (a/p): interaurale Linie, ermittelt durch eine gedachte Verbindungslinie zwischen den beiden „Ohrbalken“

medial / lateral (m/l): Mittellinie, ermittelt durch den gemittelten Verlauf der Sutura sagittalis

dorsal / ventral (d/v): Hirnoberfläche

6.3.4 Positionierung der Elektroden

Zur Implantation der Stimulationselektroden wurde die Schädeldecke zunächst beidseits 4.5mm lateral der Mittellinie und unmittelbar rostral der Sutura Lambdoidea mit einem Dentalbohrer (Bohrer: H30; Foredom; Bohrkopf Ø 1mm: Diamant Schleifstift Kugelform; Proxxon) bis zur Dura mater trepaniert und der Bohrkanal 1.5mm nach lateral erweitert. Die beiden bipolaren Stimulationselektroden (Nex-200; Rhodes Medical Instruments) wurden in zwei Stereotaxierahmen eingespannt und ihre Spitzen durch die Bohrlöcher, zunächst 2mm unterhalb der Hirnoberfläche, positioniert (Koordinaten der Stimulationselektroden spitzen: a/p + 0,5mm; m/l \pm 4,5mm; d/v - 2mm; Abbildung 8; Abbildung 9).

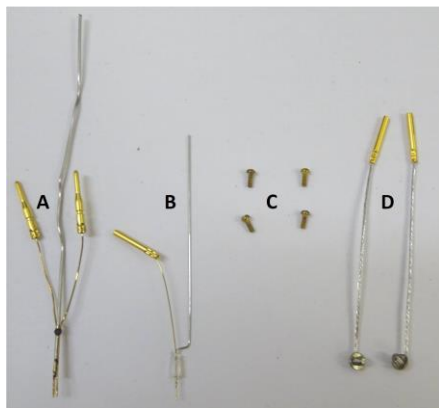


Abbildung 8: Im Versuch verwendete Elektroden und Befestigungsschrauben.

A: Stimulationselektrode, **B:** Unipolare Ableitungselektrode, **C:** Befestigungsschraube, **D:** Befestigungsschrauben mit daran gelöteter Erdungselektrode.
[Eigene Abbildung]

Zur Implantation der Ableitungselektroden wurde die Schädeldecke zunächst beidseits 2mm lateral der Mittellinie und 5mm rostral von Lambda mit einem Dentalbohrer bis zur Dura mater trepaniert. Dann wurden die beiden unipolaren Ableitungselektroden (A-M Systems) in zwei weiteren Stereotaxierahmen eingespannt und ihre Spitzen durch die Bohrkanäle zunächst 3,5mm unterhalb der Hirnoberfläche positioniert (Koordinaten der Ableitungselektroden spitzen a/p +5.4 mm; m/l \pm 2mm; d/v -3,5mm; Abbildung 8 , Abbildung 9).

Die Feinjustierung der Tiefe der Elektroden spitzen erfolgte unter Zuhilfenahme der spezifischen Morphologie der durch eine TPS evozierten Körnerzellpotentialle. Hierzu wurden die im Verlauf des TP liegenden Stimulationselektroden (Paxinos und Watson 2007) an den Stimulator (S88; Grass Instruments) angeschlossen und eine Stimulation mit einer Frequenz von 0.5 Hz und einer Amplitude von 10-20 V begonnen. Die Ableitungselektroden wurden über einen Verstärker (Model 440 Instrumentation Amplifier; Brownlee Precision) an den Empfänger (PowerLab 16/35; AD Instruments) angeschlossen. Die Signale wurden vom Empfänger an unseren Laborcomputer (MacBook; Apple) weitergeleitet und dort durch die Scope Software (AD Instruments) dargestellt und gespeichert.

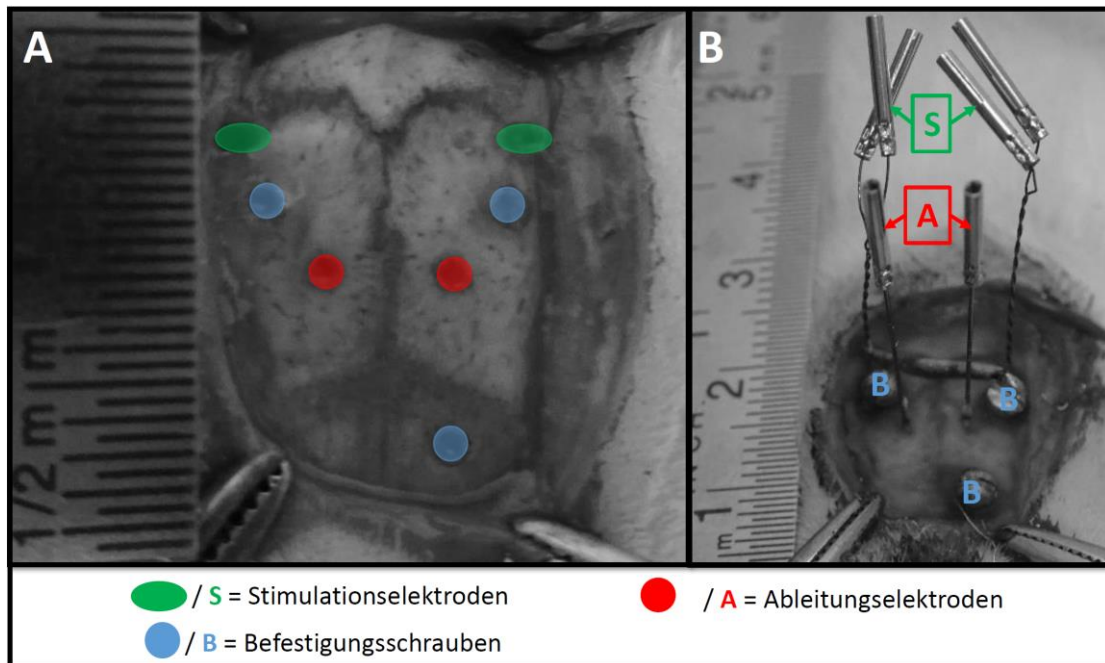


Abbildung 9: Elektrodenimplantation.

In **A** wird die mehrfach trepanierte Schädeldecke eines Versuchstiers dargestellt. Die Zugehörigkeit der Bohrlöcher ist farblich gekennzeichnet. In **B** wird ein Versuchstier dargestellt, bei dem die Elektroden und Befestigungsschrauben bereits platziert und mit einer dünnen Schicht Zahnzement fixiert wurden. Die einzelnen Elemente sind im Bild mit Buchstaben gekennzeichnet. [Eigene Abbildung; die Bilder zur Verdeutlichung der Elektrodenimplantation wurden während eines anderen Versuches aufgenommen, bei dem zum Teil andere Materialien verwendet wurden. Die Elektrodenimplantation erfolgte aber entsprechend dem Vorgehen in diesem Versuch.]

Ist die Spitze einer extrazellulären Ableitungselektrode bei elektrischer Stimulation des TP genau in der Körnerzellschicht des GD lokalisiert, wird eine positive Welle mit einem in ihr eingebetteten Population Spike (PS) abgeleitet (Andersen et al. 1966). Der abgeleitete PS ist das Summenpotential aller Aktionspotentiale der die Elektrodenspitze unmittelbar umgebenen Körnerzellen. Der PS ist maximal ausgeprägt, wenn die Elektrodenspitze von möglichst vielen Körnerzellkörpern umgeben wird und möglichst viele Fasern des TP durch die elektrische Stimulation aktiviert werden (Andersen et al. 1971; Abbildung 10).

Die Eindringtiefe der Ableitungselektroden wurde nun, unter kontinuierlicher Beobachtung der durch die TPS evozierten Potentiale, verändert. Eine optimale Tiefe der Ableitungselektroden lag vor, wenn die TPS eine positive Welle mit einem negativen PS von maximaler Amplitude evozierte (Abbildung 11). Diese Tiefe wurde beibehalten, sodass die Spitzen der Ableitungselektroden nun in einem Gebiet von hoher Körnerzellichte lagen. Nach korrekter Positionierung der Ableitungselektroden wurde

die Eindringtiefe der Stimulationselektroden verändert, bis die Amplitude des evozierten PS maximal war. Nun befanden sich die Stimulationselektroden in einer Position, in der sie eine hohe Anzahl der Fasern des TP stimulierten.

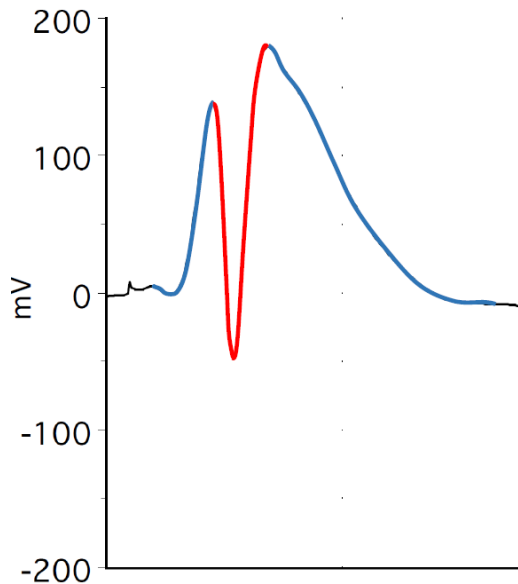
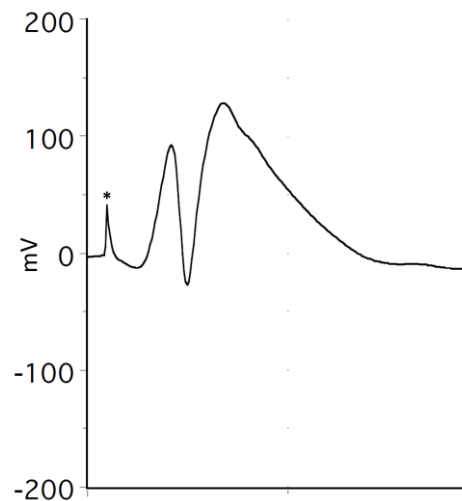


Abbildung 10: EPSP mit PS

Das abgebildete Potential wurde durch eine TPS in der Körnerzellschicht des GD evoziert. Die hier blau markierte positive Welle entsteht durch den Spannungsfluss von den elektrodennahen Körnerellsomata zu den Körnerzellendriten, sowie durch das Summenpotential der von lokalen Interneuronen erzeugten inhibitorischen postsynaptischen Potentiale IPSP (Andersen et al. 1971). Der hier rot markierte negative PS entspricht dem Summenpotential von simultan in den Körnerzellen generierten Aktionspotentialen (Andersen et al. 1971). Diesen PS wird nur abgeleitet, wenn sich die Spitze der Ableitungselektrode innerhalb der Körnerzellschicht des GD befindet (Andersen et al. 1966). [Eigene Abbildung]

Abbildung 11: In der Körnerzellschicht evoziertes extrazelluläres Potential.

Dem Stimulationsartefakt (Sternchen) folgt eine positive Welle mit einem in ihrer Mitte liegenden negativen PS von maximaler Amplitude. Die Amplitude des PS ließ sich durch Veränderung der Eindringtiefe der Ableitungselektrode nicht weiter steigern, sodass diese Position als optimale Lage der Ableitungselektrode beibehalten wurde. [Eigene Abbildung]



6.3.5 Fixierung der Elektroden / Modellierung der „Elektrodenkappen“

Nachdem alle Elektroden korrekt positioniert waren, mussten diese an der Kalotte der Ratten fixiert werden. Hierzu wurde die Schädeldecke an vier Stellen angebohrt und Juwelierschrauben so in die Bohrlöcher geschraubt, dass ein Teil der Schraube die Schädeldecke überragte. An zwei der vier Juwelierschrauben wurden zuvor Erdungskabel gelötet (Abbildung 8).

Anschließend wurde Zahnzement (Paladur®; Heraeus Kulzer) über die freipräparierte Schädeldecke gegossen. Dieser härtete nach 5min aus und fixierte die Elektroden an den in der Kalotte befestigten Schrauben. Die Stecker der Elektroden und Erdungen wurden in eine Anschlussbuchse (Ginder Scientific) gesteckt, welche ebenfalls mit Zahnzement fixiert wurde. Insgesamt wurde somit eine der Schädeldecke fest anhaftenden „Elektrodenkappe“ gebildet (Abbildung 12). Die freipräparierte Kopfhaut wurde abschließend mit einer Klammernaht (Refelex 7mm Clip Applier; Cellpoint Scientific Inc.) kaudal der „Elektrodenkappe“ verschlossen.

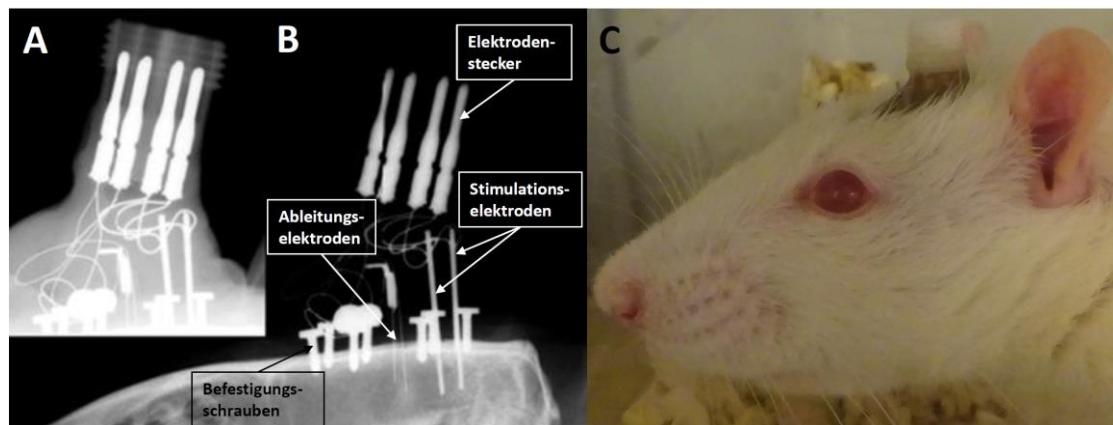


Abbildung 12: „Elektrodenkappe“

A: Aufnahme der „Elektrodenkappe“ eines Versuchstiers mit weicher Röntgenstrahlung. Hier stellen sich der Zahnzement aus Akryl sowie die Anschlussbuchse aus Plastik dar. Der Zahnzement bedeckt alle Metallkabel und wird über die Befestigungsschrauben fest mit der Schädeldecke verankert. B: Aufnahme der „Elektrodenkappe“ eines Versuchstiers mit härterer Röntgenstrahlung. Es stellt sich nur noch Gewebe hoher Dichte wie Materialien aus Metall und der Schädelknochen des Versuchstiers dar. Die einzelnen Metallstrukturen sind im Bild beschriftet. C: Aufnahme eines Versuchstiers mit „Elektrodenkappe“. [Eigene Abbildung]

6.3.6 Postoperatives Vorgehen

Postoperativ erhielten alle Ratten 5ml Kochsalzlösung (0.9%) und 2mg Gentamicin (Sigma-Aldrich) subkutan (s.c.). Das Antibiotikum wurde vor allem als postoperative Prophylaxe gegen die „Schädelfäule“ verabreicht. Dies ist eine Osteomyelitis, welche seit der Verwendung von pathogenfreien Ratten häufig auftritt und zu einer Aufweichung der Kalotte führt. Diese Aufweichung der Kalotte führt zu einem leichteren Ausbrechen der Befestigungsschrauben und zu einem Verlust der „Elektrodenkappe“ (McIntyre 2006, S. 352).

6.4 Tractus perforans Stimulationen

Um eine ausreichende Erholung von der Operation zu gewährleisten, wurde mit der ersten Stimulation erst eine Woche nach Elektrodenimplantation begonnen. Bei den TPS wurde das von Norwood et al. entwickelte Stimulationsprotokoll (Norwood et al. 2010; Norwood et al. 2011; Will et al. 2013; Vieira et al. 2016) verwendet. Dazu wurden drei Tractus-perforans-Stimulationen in einem Abstand von jeweils 24h durchgeführt. An den Tagen 7 und 8 wurden die Versuchstiere über 30min stimuliert, am Tag 9 über 8h.

Die TPS wurden in einem von der Feinmechanik Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Marburg gefertigten Stimulationskäfig aus Plexiglas durchgeführt. Die „Elektrodenkappen“ der Versuchstiere wurden über ein biegsames, frei rotierendes Kabel an den Stimulator und den Empfänger angeschlossen. Die korrekte Durchführung der Stimulation konnte durch die zeitgleich durchgeführte Analyse der evozierten Körnerzellpotentiale verifiziert werden. (Abbildung 13)

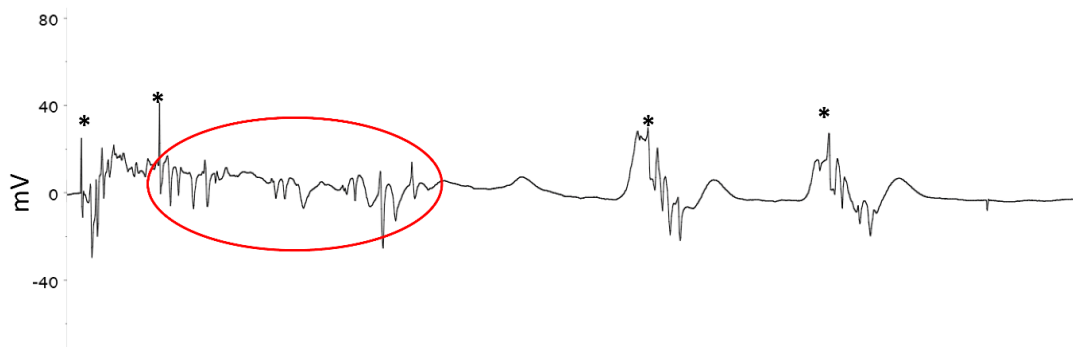


Abbildung 13: Ausschnitt der Körnerzellaktivität während der 30 min Stimulation.

Nach jedem Impuls der Doppelpuls-Stimulationen (**Sternchen**) kommt es zum Auftreten von epileptiformen Entladungen (**rot umrandeter Bereich**). Diese epileptiformen Entladungen können nur bei korrekter Lokalisation der Stimulations- und Ableitungselektroden beobachtet werden. Der dargestellte Abschnitt wurde 20s nach einem Zug von 20Hz Einzelimpulsen aufgenommen. Im Anschluss an die 20Hz Einzelimpuls-Züge kam es während der Stimulationen zu ausgeprägten epileptiformen Entladungen, welche teilweise mit klinischen Anfallssymptomen vergesellschaftet waren. [Eigene Abbildung]

6.4.1 30 min Stimulationen

Die TPS bestand aus bilateralen Doppelpuls-Stimulationen mit einer Frequenz von 2Hz und einem Interpuls-Interval von 40ms. Zusätzlich wurde mit Zügen von Einzelimpuls-Stimulationen mit einer Frequenz von 20Hz stimuliert. Diese Züge wurden ein Mal pro Minute über eine Dauer von 10s durchgeführt. Alle Impulse hatten eine Dauer von 0,1ms und eine Amplitude von 20-24V. Bei dieser Spannung kommt es zu Körnerzell-Entladungen ohne eine gewebeschädigende Hydrolyse auszulösen, welche bei höheren Spannungen auftreten kann (Norwood et al. 2010).

Während der Stimulationen traten unmittelbar nach den 20Hz Zügen längere epileptiforme Entladungen auf (Abbildung 13). Während dieser epileptiformen Entladungen wurden klinische Anfälle beobachtet, deren Schweregrad von klonischen Entäußerungen der Vorderpfoten bis zu einer tonischen Überstreckung des Rumpfes mit anschließendem Sturz reichten. Dies entspricht einer Anfallsschwere von 3-5 auf der Racine Scala (Racine 1972).

Nach Beendigung der Stimulation persistierte die epileptiforme Körnerzellaktivität. Da der resultierende Hirnschaden in post-SE-Tiermodellen vor allem mit der Länge des SE korreliert (Ben-Ari et al. 1980a; Ben-Ari et al. 1980b; Ben-Ari und Dudek 2010), sollte der SE zu einer möglichst einheitlichen Zeit medikamentös terminiert werden (Löscher und Brandt 2010, S. 686). Daher wurde den Versuchstieren unmittelbar nach dem Stimulationsende Isofluran (Forene®; AbbVie) per inhalationem (p.i.) verabreicht (Abbildung 14).

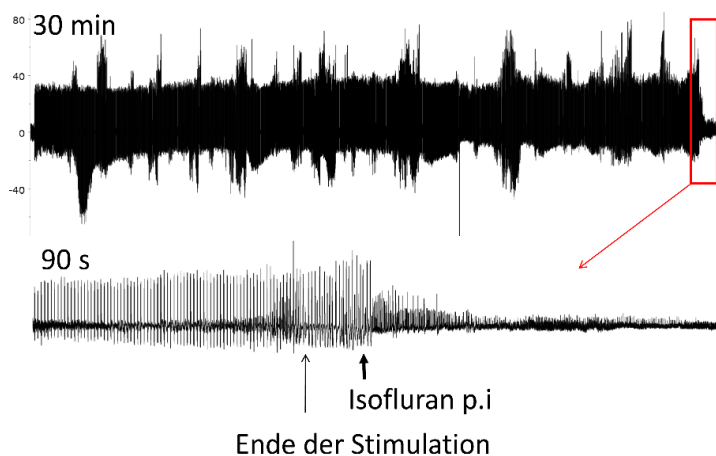


Abbildung 14: Während der 30 Minuten Stimulation aufgezeichnete Körnerzellaktivität.

Im oberen Bildabschnitt wird die Körnerzellaktivität während der kompletten Stimulation dargestellt. Die letzten 90s der aufgezeichneten Körnerzellaktivität sind im unteren Bildabschnitt in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Nach dem Ende der Stimulation (**dünner Pfeil**) persistieren die epileptiformen Entladungen. Erst nach der Gabe von Isofluran p.i. (**dicker Pfeil**) sistieren die epileptiformen Entladungen. Etwa 30s nach Isofluran-Gabe entspricht die Körnerzellaktivität der Grundaktivität vor TPS. [Eigene Abbildung]

6.4.2 8h Stimulation

Die TPS über 8h erfolgte mit denselben Parametern wie die beiden Stimulationen über 30min (2 Hz Doppelpuls-Stimulationen mit 40ms interpuls-Intervall; 20 Hz Einzelpuls Zügen über 10s einmal pro Minute; Impulsdauer 0,1ms; Amplitude 20-24V).

Während der Stimulationen traten jeweils nach den 20Hz Einzelpuls Zügen, epileptiforme Entladungen auf. Diese persistierten über wenige Sekunden und führten nur selten zu klinisch erfassbaren Anfällen. Der Schweregrad der Anfälle reichte von star-

ren und oralen Automatismen bis zu einem repetitiven Nicken des Kopfes. Dies entspricht einer Anfallsschwere von 1-2 auf der Racine Scala (Racine 1972).

Nach Beendigung der TPS über 8h wurden keine persistierenden epileptiformen Entladungen beobachtet, sodass keine pharmakologische Terminierung der epileptiformen Aktivität durchgeführt werden musste.

6.5 Tractus perforans Durchtrennung

Um zu gewährleisten, dass der TP während der kompletten Latenzzeit durchtrennt ist, die TPS aber nicht beeinflusst werden, erfolgte die Tractus perforans Durchtrennung (TPD) unmittelbar nach Abschluss der dritten TPS. Der Eingriff erfolgte unter Vollnarkose mit 120mg/kgKG Ketamin i.p. und 5mg / kgKG Xylazin i.p. Die Augen der Versuchstiere wurden mit Augensalbe bestrichen, um ein austrocknen während der Narkose zu verhindern.

6.5.1 Implantation der Ableitungselektroden II

Nach der Überprüfung einer ausreichend tiefen Analgosedierung wurde die „Elektrodenkappe“ durch konstanten seitlichen Druck entfernt. Anschließend erfolgte die beidseitige Elektrodenimplantation auf oben genauer beschriebene Weise. Hierbei wurden die Bohrlöcher der ersten Elektrodenimplantation für die Positionierung der Elektroden genutzt. Für die Befestigung der vier Juwelierschrauben wurde der Schädel an bisher unbeschädigten Bereichen der Kalotte trepaniert, um einen stabilen Halt der Elektrodenkappe zu gewährleisten. Die Stimulationselektroden wurden nach korrekter Feinjustierung der Ableitungselektroden nicht mehr benötigt und daher entfernt.

6.5.2 Methode und Lokalisation der Tractus perforans Durchtrennung

Um den Einfluss einer intakten Verbindung zwischen MEC und Hippocampus auf die Epileptogenese zu untersuchen, sollte die Hauptverbindungen zwischen diesen Strukturen unterbunden werden. Da der EC über eine hohe Anzahl anatomischer Faserbahnen mit dem Hippocampus verbunden ist (van Strien et al. 2009), würde eine beidseitige Durchtrennung aller Bahnen mit einem großen neuronalen Schaden einhergehen. In Tierversuchen mit traumatischen Hirnverletzungen korreliert das Ausmaß des SHT positiv mit der Mortalität (McIntosh et al. 1989) und der Auftrittswahrscheinlichkeit einer posttraumatischen Epilepsie (Pitkanen et al. 2009; Kharatishvili und Pitkanen 2010). Um den traumatischen Hirnschaden zu minimieren wurde daher eine partielle

Durchtrennung der Verbindungen zwischen EC und Hippocampus durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse von Experimenten, bei denen Hirnläsionen einen Einfluss auf die Epileptogenese hatten (Kohler et al. 1978; Ben-Ari et al. 1980b; Savage et al. 1985; Ribak und Khan 1987 s. Diskussion) und da der entorhinale Zellverlust bei Tieren und Patienten mit TLE meist auf den MEC beschränkt ist (Du et al. 1993; Du et al. 1995), wurde der mediale Anteil des TP durchtrennt, welcher die efferenten Bahnen vom MEC zum Hippocampus beinhaltet. Die Durchtrennungen des medialen Anteils des TP erfolgten stereotaktisch an folgenden Koordinaten:

Anwinkeln des Messers von der Frontalebene ausgehend um 10° nach kaudal; a/p: + 0 mm; m/l: beidseits. 3-7 mm; tiefe: bis zur Schädelbasis (Deller et al. 2006).

Diese Koordinaten werden von der Arbeitsgruppe von Prof. Deller et al. seit Jahren verwendet, um den Hippocampus in der frontalen Ebene zu deafferenzieren (Deller et al. 1995; Schafer et al. 2008; Del Turco et al. 2003; Dehn et al. 2006; Deller et al. 2006). Da elektrolytische Gehirnläsionen epileptische Anfälle auslösen können (Kelley und Steward 1996), wurden die Läsionen mechanisch mit einem Mikromesser durchgeführt.

6.5.3 Tractus perforans Durchtrennung (Versuchsgruppe)

Nach korrekter Positionierung der Ableitungselektroden wurde bei den Tieren der Versuchsgruppe die TPD durchgeführt. Hierzu wurde die Schädeldecke beidseits 3mm lateral der Mittellinie und auf der interauralen Linie bis zur Dura mater trepaniert. Der Bohrkanal wurde um jeweils 4mm nach lateral erweitert, das sichelförmige Mikromesser (FineScienceTools) in den Stereotaxiearm eingespannt und von der Frontalebene ausgehend um 10° nach kaudal geneigt. Daraufhin wurde mit dem 2mm breiten Mikromesser pro Seite drei- bis viermal zwischen 3-7mm lateral der Mittellinie von der Gehirnoberfläche bis zur Schädelbasis geschnitten. Das Mikromesser, welches auch Klingen an den Seiten aufwies, wurde zusätzlich auf Höhe der Schädelbasis und auf halber Höhe zwischen Schädelbasis und Gehirnoberfläche einmal von medial nach lateral gezogen (Abbildung 15).

6.5.4 Scheinbare Durchtrennung (Kontrollgruppe)

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde eine scheinbare TPD durchgeführt. Hierzu wurde die Schädeldecke, beidseits 3mm lateral der Mittellinie auf der interauralen Linie, trepaniert. Danach wurde der Bohrkanal beidseits um jeweils 4mm nach lateral

erweitert. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde nun keine TPD durchgeführt, sondern direkt mit der Modellierung der Elektrodenkappe begonnen.

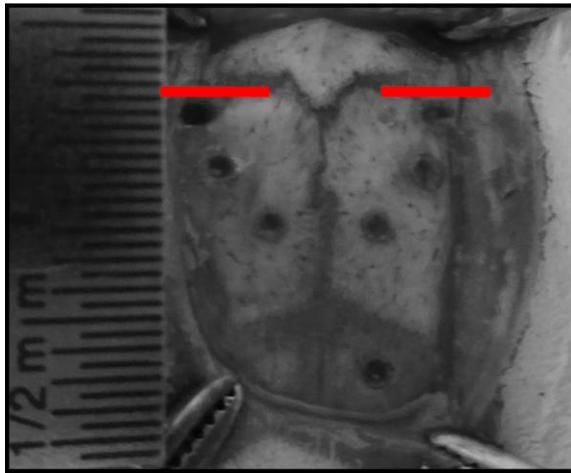


Abbildung 15: Schnittführung bei der TPD.

Die Schädeldecke der Versuchstiere wurde in dem rot markierten Bereich trepaniert. Anschließend erfolgte die TPD auf der interauralen Linie von 3-7mm lateral der Mittellinie, mit einem um 10° nach kaudal geneigtem Mikromesser. In der Abbildung wird die Beziehung der TPD zu den Stimulationselektroden verdeutlicht. [Eigene Abbildung]

6.5.5 Modellierung der Elektrodenkappe und postoperatives Vorgehen

Nach der (bei Kontrollen scheinbaren) TPD erfolgte die Modellierung der „Elektrodenkappe“ entsprechend dem Vorgehen bei der ersten Operation. Postoperativ erhielten die Versuchstiere 5ml NaCl Lösung und 2mg Gentamicin s.c.

6.6 Beobachtung der Versuchstiere

Während der elektroenzephalographischen (EEG-)Beobachtung sind die Versuchstiere über ihre „Elektrodenkappe“ an ein flexibles Ableitungskabel angeschlossen. Hierdurch wird bei ruckartigen Bewegungen der Versuchstiere zusätzlicher Zug auf die „Elektrodenkappe“ ausgeübt, was zu einem häufigeren Verlust der „Elektrodenkappe“ unter Beobachtungsbedingungen führt. Um die Rate der Tiere, die ihre „Elektrodenkappe“ vor Abschluss der Beobachtungszeit verlieren zu minimieren, wurde mit der Beobachtung der Versuchstiere erst 14 Tage nach Abschluss der Stimulationen, am Tag 23, begonnen. Da der erste spontane epileptische Anfall im NKTPS-Tiermodell der TLE erst durchschnittlich 21.5 Tagen (Spanne 16-25 Tage) nach der letzten TPS auftritt (Norwood et al. 2010), werden auch bei einer erst zwei Wochen nach der letzten TPS beginnenden Beobachtung alle epileptischen Anfälle erfasst.

Bisher gibt es keine Daten zur durchschnittlichen Anfallsfrequenz im NKTPS-Tiermodell. Im Kainat-Tiermodell beträgt das längste Intervall zwischen zwei epileptischen Anfällen 4.36 ± 2.65 Tage (Median 4,1 Tage / Spanne 0.94-8.5 Tage; (Williams et al. 2009b). Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde ein angestrebter Beobach-

tungszeitraum von 18 Tagen festgelegt. Dieser Zeitraum entspricht mehr als dem doppelten des von Williams et al. im Kainat-Tiermodell gemessenen längsten Intervalls zwischen zwei Anfällen. Kommt es in diesem Zeitraum nicht zum Auftreten spontaner epileptischer Anfälle, so ist die Entstehung von epileptischen Anfällen auch zu einem späteren Zeitpunkt unwahrscheinlich.

6.6.1 Elektroenzephalographische-Beobachtung

Vierzehn Tage nach Abschluss der TPS wurde mit der EEG-Beobachtung begonnen. Die extrazelluläre Ableitung der Körnerzellaktivität erfolgte in den Käfigen der Versuchstiere (Abbildung 16). Hierzu wurde die „Elektrodenkappe“ der Versuchstiere über ein Ableitungskabel mit dem Empfänger verbunden. Empfangene Daten wurden an unserem Labor Computer mit der LabChartPro Software (AD Instruments) dargestellt und automatisch alle drei Stunden digital gespeichert. Die Ableitung der Körnerzellaktivität erfolgte kontinuierlich über 24h an jedem Tag und wurde nach 18 Tagen, oder bei Verlust der „Elektrodenkappe“, beendet.

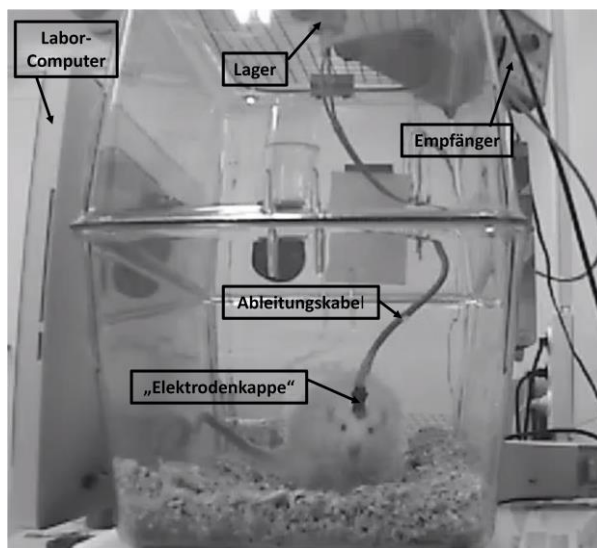


Abbildung 16: Beobachtung eines Versuchstieres.

Während der Videobeobachtung wird die kurze Querseite des Käfigs fokussiert. Das Versuchstier befindet sich in einem extra hohen Plexiglaskäfig, dessen Decke durch Vollerenddraht ersetzt wurde. Das stahlummantelte Ableitungskabel ist über einen Schraubverschluss mit der „Elektrodenkappe“ des Versuchstiers verbunden. Das Ableitungskabel endet an einem frei rotierenden Lager an der Käfigdecke und erlaubt der Ratte somit uneingeschränkte Bewegungsfreiheit. Über den Empfänger ist das Ableitungskabel mit dem Labor-Computer verbunden, wo die abgeleitete Körnerzellaktivität alle 3 Stunden automatisch digital gespeichert wird. [Eigene Abbildung]

6.6.2 Videobeobachtung

Die Videobeobachtung der Versuchstiere erfolgte zeitgleich mit der EEG-Beobachtung (Beginn am Tag 23 über einen Zeitraum von 18 Tagen). Hierzu wurde eine Infrarot-Kamera (AirCam OD-325HD; Airlive Company) verwendet, welche eine nächtliche Beobachtung der Versuchstiere ermöglichte, ohne diese durch eine kontinuierliche Beleuchtung zu beeinträchtigen. Die Kamera wurde außerhalb des Käfigs positioniert und die kürzere Querseite des Käfigs fokussiert (Abbildung 16), was die zeitglei-

che Beobachtung von zwei Versuchstieren ermöglichte. Die Videobeobachtung erfolgte kontinuierlich über 24h an jedem Tag und wurde nach 18 Tagen, oder bei Verlust der „Elektrodenkappe“, beendet. Die Videodaten wurden an den Labor Computer übermittelt und dort von der Überwachungssoftware SecuritySpy (Ben Software) mit 15 Bildern/s aufgenommen. Zur späteren Integration des Videomaterials mit den EEG-Daten wurden die Videodaten mit dem Zeitpunkt der Aufnahme versehen und automatisch alle 30min digital gespeichert.

6.6.3 Analyse der Daten

Die Analyse der Körnerzellaktivität erfolgte mit der LabChartPro Software. Da alle Versuchstieren über zwei Ableitungselektroden verfügten, wurde zu Beginn der elektrophysiologischen Beobachtung der Kanal mit den wenigsten Artefakten ausgewählt und die weitere Analyse mit den Daten dieses Kanals durchgeführt.

Die Analyse der Körnerzellaktivität erfolgte visuell in Blöcken von jeweils drei Stunden Dauer in einem zeitlichen Maßstab von 1:500. Körnerzellaktivitäten mit einer Amplitude, die sichtbar größer war als die Grundaktivität, wurden in einer höheren zeitlichen Auflösung genauer analysiert. Zusätzlich erfolgte bei Auffälligkeiten der Körnerzellaktivität die Sichtung des zeitgleich aufgenommenen Videomaterials.

Als elektrophysiologisch gesicherter Anfall galt eine Periode mit beständiger Veränderung der Amplitude und Frequenz der elektrischen Aktivität, sodass diese sich grundlegend von der interiktalen Grundaktivität unterschied. Die Periode musste für mindestens 10s persistieren (Bragin et al. 2005, S. 1593).

Bei einem elektrophysiologisch gesicherten Anfall wurden die zum Anfallszeitpunkt erfassten Daten der Videokamera analysiert. So wurde das klinische Korrelat des epileptischen Anfalls erfasst. Die Anfallssemiologie wurde mit der Racine Scala in klinische Schweregrade eingeteilt (Racine 1972; Tabelle 2). Die Klasse der Racine-Skala beschreibt hierbei die „schwerste“ bei einem Anfall vorliegende Symptomatik.

Tabelle 2: Die fünf Klassen der Racine-Skala (Racine 1972)

Klasse der Racine-Skala	Anfallssemiologie
I	repetitive Bewegungen der Schnauze / des Gesichtes
II	repetitives Kopfnicken
III	klonische Bewegungen der Vorderpfoten
IV	tonisches Aufbäumen
V	tonisches Aufbäumen mit anschließendem Sturz

6.7 Perfusionsfixierung und Aufarbeitung des histologischen Gewebes

Im NKTPS-Tiermodell kommt es spätestens 9 Wochen nach der letzten TPS zu einer ausgeprägten Schrumpfung beider Hippocampi (Norwood et al. 2010). Um die vollständige Ausbildung der chronischen histologischen Veränderungen des Hippocampus zu ermöglichen, erfolgte die Tötung der Versuchstiere mit anschließender histologischer Aufarbeitung daher frühestens 10 Wochen nach Abschluss der TPS.

6.7.1 Perfusionsfixierung

Die Versuchstiere wurden mit 200mg/kg KG Ketamin i.p. tief analgosediert. Unmittelbar vor der Perfusionsfixierung erfolgte zunächst die elektrophysiologische Validierung der TPD (s.u.). Anschließend wurde den sedierten Tieren mit einer Schere (Fine Science Tools) der Brustkorb eröffnet und das Herz freipräpariert. Die Aorta ascendens wurde mit einer Kanüle punktiert und der rechte Vorhofhof mit einer Skalpellspitze (Fine Science Tools) eröffnet, um einen Abfluss des Perfusats zu ermöglichen. Die Perfusionsfixierung erfolgte über die Kanüle in der Aorta ascendens zunächst mit 0,9 % Kochsalzlösung über 2min und daraufhin über 10min mit 4% Paraformaldehyd (Merck KGaA) in 0.1 M Phosphatpuffer (PP) (pH 7.4; Merck KGaA). Sofort nach Beendigung der Perfusionsfixierung wurden die Ratten mit einer Schere dekapitiert. Die Schädeldecke wurde eröffnet, das Gehirn entnommen und in eine Lösung mit 4% Paraformaldehyd gegeben. In dieser Lösung wurden die Gehirne der Versuchstiere bei 4°C über mindestens 48h gelagert.

Nach vorheriger mindestens dreitägiger Lagerung der Gewebestücke in einer 30% Saccharose-Lösung (in PP; Merck KGaA) wurden die Präparate mit Trockeneis schockgefroren und mit einem Kryotom (CM3050 S Kryostat; Leica) in 30µm dicke transversale Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden anschließend für die histologische Analyse gefärbt.

6.7.2 Nissel-Färbung

Die nach dem Neurologen Franz Nissel (1860-1919) benannte Nissel-Färbung wird dazu verwendet, die Somata von Nervenzellen sowie die Zellkörper von Neuroglia darzustellen. Das heutzutage für diese Färbung verwendete Kresylviolett ist ein basischer Farbstoff, der bevorzugt an den sauren (positiv geladenen) Inhalt des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) und an saure Zellkerne bindet. Die Somata und Zellkerne von Nervenzellen färben sich daher violett an. Die Somata der Neuroglia enthalten weniger RER, sodass sich bei diesen nur der saure Zellkern anfärbt (Nissl-Färbung - Lexikon der Neurowissenschaft 2015).

Für die Nissel-Färbung wurde zunächst das verbleibende Formaldehyd sowie im Gewebe enthaltende Lipide durch ein Bad der Schnitte in absteigend konzentriertem Ethanol (Otto Fischar GmbH) entfernt. Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte mit Kresylviolett (Konzentration 0,01%; Certistain; Merck KGaA). Nach der Färbung wurde das Gewebe durch ein Bad in ansteigend konzentriertem Ethanol dehydriert und die überschüssige Farbe entfernt. Abschließend wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und auf Adhäsionsobjektträgern (Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides) befestigt (Abbildung 17).

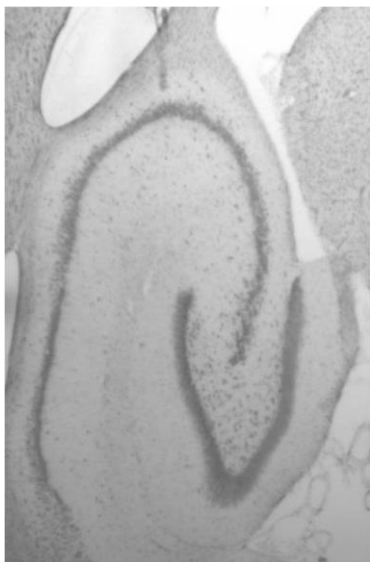


Abbildung 17: Nissel gefärbter Hippocampus.

In 1,6-facher Vergrößerung angefertigte Schwarz-Weiß-Aufnahme des linken Hippocampus von Versuchstier Nr. 26. Der histologische Schnitt wurde mit Nissel gefärbt. Die Somata von Neuronen stellen sich wegen ihres hohen Gehalts an rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) dunkel dar. Dies erkennt man gut an der dunkel gefärbten Körnerzellschicht des Gyrus dentatus. Gleichzeitig werden auch die Zellkerne nicht-neuronaler Zellen (z.B. in der Molekularschicht des Gyrus dentatus) angefärbt (Nissl-Färbung - Lexikon der Neurowissenschaft 2015). [Eigene Abbildung]

6.7.3 NeuN Immunhistochemie

Die immunhistochemische Markierung des neuronalen Proteins Neuronal Nuclei (NeuN) wird seit ihrer Entwicklung durch Mullen et al. (Mullen et al. 1992) nun schon über zwei Jahrzehnten für die selektive Färbung reifer Neuronen verwendet (Preusser et al. 2006; Maxeiner et al. 2014; Duan et al. 2015). Die Darstellung des neuronalen Proteins NeuN erfolgt indirekt immunhistochemisch. Hierzu wird ein monoklonaler Maus anti-NeuN Antikörper auf das histologische Gewebe gegeben, welcher dort an sein Antigen bindet. Dann wird ein sekundärer biotinylierter Anti-Maus Antikörper hinzugegeben, welcher an das Fc-Fragment des primären Antikörper bindet (Immunhistologie - Pathologie-Online). Nun werden Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-(ABM-)Komplexe hinzugegeben. Das Eiweißglykoprotein Avidin des ABM-Komplexes weist eine starke Affinität zu dem an den sekundären Antikörper gekoppelten Vitamin Biotin auf und bindet an diesen (ABC-Technik - Lexikon der Biochemie; Hsu und Raine 1981).

Die permanente Färbung der histologischen Schnitte erfolgt nun enzymatisch. Hierzu wird Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidine hinzugegeben. Hierbei sollen im Gewebe in geringen Mengen vorhandene unspezifische Peroxidasen durch das Wasserstoffperoxid inaktiviert werden. Das 3,3'-Diaminobenzidine wird daraufhin nur noch von der Meerrettichperoxidase des ABM-Komplexes oxidiert und nimmt im oxidierten Zustand eine braune Farbe an (Immunhistologie - Pathologie-Online). Somit werden die Bereiche des histologischen Schnittes in denen NeuN vorkommt, permanent bräunlich gefärbt (Abbildung 18).

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst mit normalem Eselserum (1:100 verdünnt in PP; S30; Merck KGaA) für 2h blockiert. Hierdurch soll die unspezifische Bindung des primären Antikörpers an nicht NeuN tragende Proteine verhindert werden. Anschließend wurden die histologischen Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper Maus-anti-NeuN (1:10000 verdünnt in PP; MAB377; Chemicon) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte über 2h mit biotynilierten sekundären Antikörpern (1:2000 verdünnt in PP; Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody BA-9200; Vector) inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte zwei Mal in PP gewaschen und über 2h bei Raumtemperatur in einer Lösung mit ABM-Komplex (1:1,000 verdünnt in PP; Vectastatin Elite ABC Kit PK-6100; Vector) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte weitere drei

Mal in PP gewaschen und in einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) entwickelt. Nach Entfärbung und Dehydration in ansteigend konzentriertem Alkohol wurden die Präparate auf Adhäsionsobjektträgern befestigt und konnten unter dem Mikroskop analysiert werden.

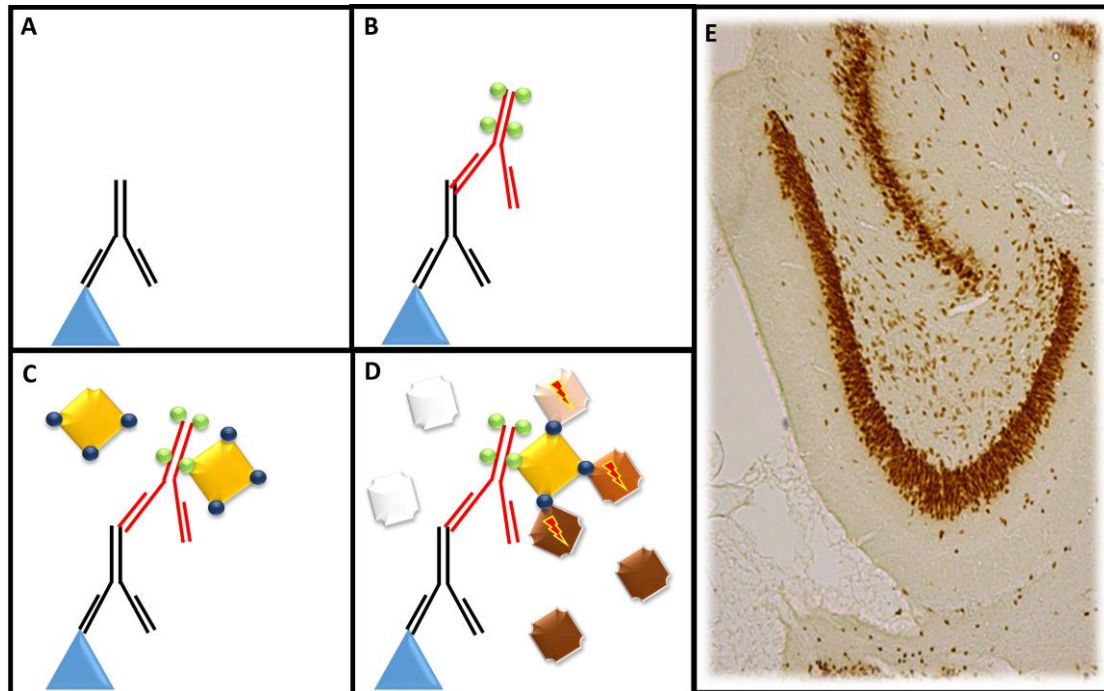


Abbildung 18: Ablauf der immunhistochemischen Färbung mit NeuN

A: Der primäre anti-NeuN Antikörper bindet an das Epitop des Antigens NeuN. **B:** Der biotinylierte sekundäre Antikörper bindet an das Fc-Fragment des primären Antikörpers. **C:** Die ABM-Komplexe binden an das Biotin des sekundären Antikörpers. **D:** Die Meerrettichperoxidase des ABM-Komplexes oxidiert farbloses 3,3'-Diaminobenzidine, welches daraufhin dauerhaft eine braune Farbe annimmt. **E:** Histologisches Präparat des GD nach immunhistochemischer Färbung von NeuN. Die Zellkerne der Nervenzellen werden dauerhaft braun gefärbt, besonders gut erkennt man dies an den Körnerzellen des GD. [Eigene Abbildung]

6.8 Messung der Hippocampusfläche

Die Schrumpfung des Hippocampus ist im NKTPS-Tiermodell so ausgeprägt, dass schon in der Übersichtsaufnahme (1.6-fache Vergrößerung) eindeutig identifizierbar ist, welche Tiere eine HS entwickelt haben. Um auch kleinere Unterschiede im Ausmaß der Schrumpfung des Hippocampus zu erfassen, wurden die Hippocampusflächen in transversalen histologischen Schnitten gemessen und miteinander verglichen.

Die Messung der Hippocampusfläche erfolgte, entsprechend der vorherigen Arbeiten mit dem NKTPS-Tiermodell (Norwood et al. 2010; Will et al. 2013), digital mit der Messfunktion von Photoshop CS5 (Adobe). Transversale, mit der Nissel-Methode gefärbte histologische Schnitte, wurden entsprechend ihrer Position im Gehirn von dorsal

nach ventral geordnet. Jeder fünfte Schnitt wurde für die weitere Analyse ausgewählt. Die Flächenbestimmung erfolgte in übereinstimmenden transversalen Schnitten des dorsalen Hippocampus, basierend auf der Identifikation von extrahippocampalen Gehirnregionen wie dem dorsalen Kerngebiet des Thalamus und der Form der Ventrikel. Die für die weitere Analyse ausgewählten Schnitte wurden mit einem Mikroskop (DM4000 BLED; Leica) in 1.6-facher Vergrößerung abfotografiert (DFC 295 Mikroskop Kamera; Leica). Zusätzlich wurde ein Skalierungsgitter mit 0.0625mm^2 großen quadratischen Kästchen in gleicher Vergrößerungsstufe abfotografiert, um später den Abbildungsmaßstab des Hippocampus zu bestimmen (Abbildung 19). Die Fotografien wurden digital auf unserem Laborcomputer gespeichert.

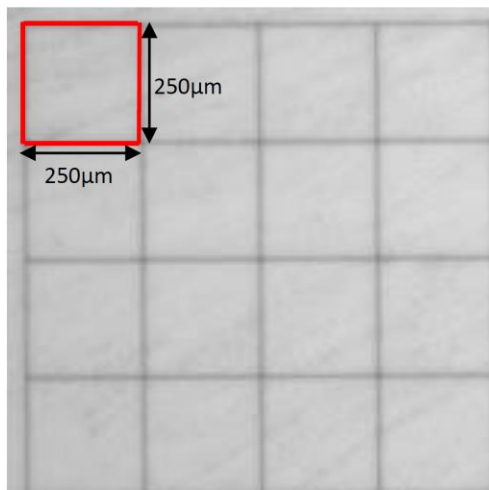


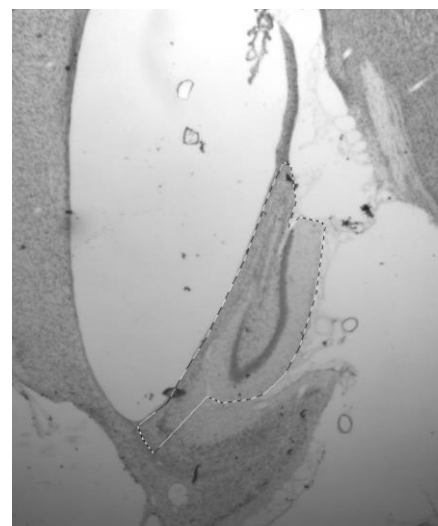
Abbildung 19: Skalierungsgitter

In 1.6-facher Vergrößerung aufgenommenes Skalierungsgitter. Ein quadratisches Kästchen des Skalierungsgitters hat eine Kantenlänge von $250\mu\text{m}$, die Fläche eines solchen Kästchens beträgt somit 0.0625mm^2 . Zur Bestimmung des Abbildungsmaßstabes der Aufnahmen des Hippocampus wurde die Fläche dieses Kästchens mit Photoshop errechnet. Der so errechnete Wert von 1560 Flächeneinheiten entsprach der Fläche von $0,0625\text{ mm}^2$. Somit entsprachen 24960 Flächeneinheiten der Fläche von 1mm^2 . Anschließend wurden die mit Photoshop errechneten Hippocampusflächen durch 24960 geteilt um sie in mm^2 umzurechnen. [Eigene Abbildung]

Die Fläche des linken Hippocampus wurde in den abfotografierten Schnitten mit Photoshop errechnet. Hierzu wurde der linke Hippocampus mit einem Marker umrandet. Wegen der guten visuellen Bestimmbarkeit des Übergangs von CA1 zum Subiculum wurde dieser als kaudale Begrenzung des Hippocampus gewählt (Abbildung 20).

Abbildung 20: Ermittlung der Hippocampusfläche

*In 1.6-facher Vergrößerung abfotografierter, mit der Nissel-Methode gefärbter Schnitt des linken Hippocampus eines Versuchstiers. Um seine Fläche zu bestimmen wird der Hippocampus mit einem Marker (**gestrichelte Linie**) umrandet und die umrandete Fläche mit der Messfunktion von Photoshop errechnet. Der Übergang zwischen CA1 und dem Subiculum wird hier als kaudale Grenze des Hippocampus verwendet. Das Subiculum ist eigentlich Teil des Hippocampus (van Strien et al. 2009), kann aber visuell nur schwer von dem kaudal daran angrenzenden Praesubiculum abgegrenzt werden. Die Grenze zwischen CA1 und Subiculum ist im Gegensatz dazu durch die Verbreiterung der Pyramidenzellschicht (Lamina II) eindeutig identifizierbar (van Strien et al. 2009). [Eigene Abbildung]*



Nach der Umrandung des Hippocampus wurde die Fläche des eingegrenzten Areals mit der Messfunktion von Photoshop bestimmt und der Abbildungsmaßstab des eingegrenzten Areals durch den Vergleich mit der Fläche eines kleinen quadratischen Kästchens des Skalierungsgitters bestimmt (Abbildung 19). Die so in mm² ermittelten Flächen des linken Hippocampus wurden anschließend als Gruppenwerte verglichen.

6.9 Neuronenzählungen

Um die Auswirkung der TPD auf den im NKTPS-Tiermodell entstehenden Neuronenverlust zu analysieren, wurden die Neuronen von Teilen des Hippocampus gezählt. Hierzu erfolgte eine genauere Analyse des histologischen Gewebes von je 3 Ratten der TPD- und der Kontrollgruppe, deren Hippocampus in Nissel gefärbten Übersichtsaufnahmen als eindeutig geschrumpft imponierte. Um die Relation des hippocampalen Neuronenverlustes zu bestimmen, erfolgten zusätzlich Neuronenzählungen bei 2 Tieren der Kontrollgruppe, welche weder eine Schrumpfung des Hippocampus, noch Hinweise auf einen ausgeprägten Neuronenverlust in mit Nissel gefärbten Übersichtsaufnahmen aufwiesen (siehe S - 67 -).

Die Durchführung der hippocampalen Zellzählungen erfolgte entsprechend dem Vorgehen in vorherigen Experimenten (Kienzler et al. 2009; Norwood et al. 2010). Da in Nissel gefärbten Schnitten auch durch den Zellschaden proliferierende Gliazellen angefärbt werden, erfolgten die Neuronenzählungen in NeuN gefärbten histologischen Schnitten. Die Zählungen beschränkten sich auf die Neuronen des Hilus und des CA. Eine Differenzierung in die Unterregionen des CA wurde nicht durchgeführt, da dies aufgrund der aufgehobenen Struktur des Hippocampus bei ausgeprägter HS nicht möglich war.

Die Neuronenzählungen erfolgten in übereinstimmenden transversalen Schnitten des dorsalen Hippocampus, basierend auf der Identifikation von extrahippocampalen Gehirnregionen wie z.B. der Form der Ventrikel. Hierbei beschränkte sich die Analyse auf den dorsalen Anteil des Hippocampus, da der ventrale Hippocampus im NKTPS-Tiermodell meist so stark schrumpft, dass transversale Schnitte kein hippocampales Gewebe mehr beinhalteten (Norwood et al. 2010). Um die Angabe der Neuronenzahl in Neuronen / mm² (N/mm²) zu ermöglichen, erfolgte zunächst die Bestimmung der Fläche des Hilus und des CA. Hierbei wurde trotz der Verwendung eines anderen Bild-

bearbeitungsprogramms (Image J; <http://imagej.nih.gov/ij/>) entsprechend der Messung der Hippocampusfläche vorgegangen (Abbildung 21).

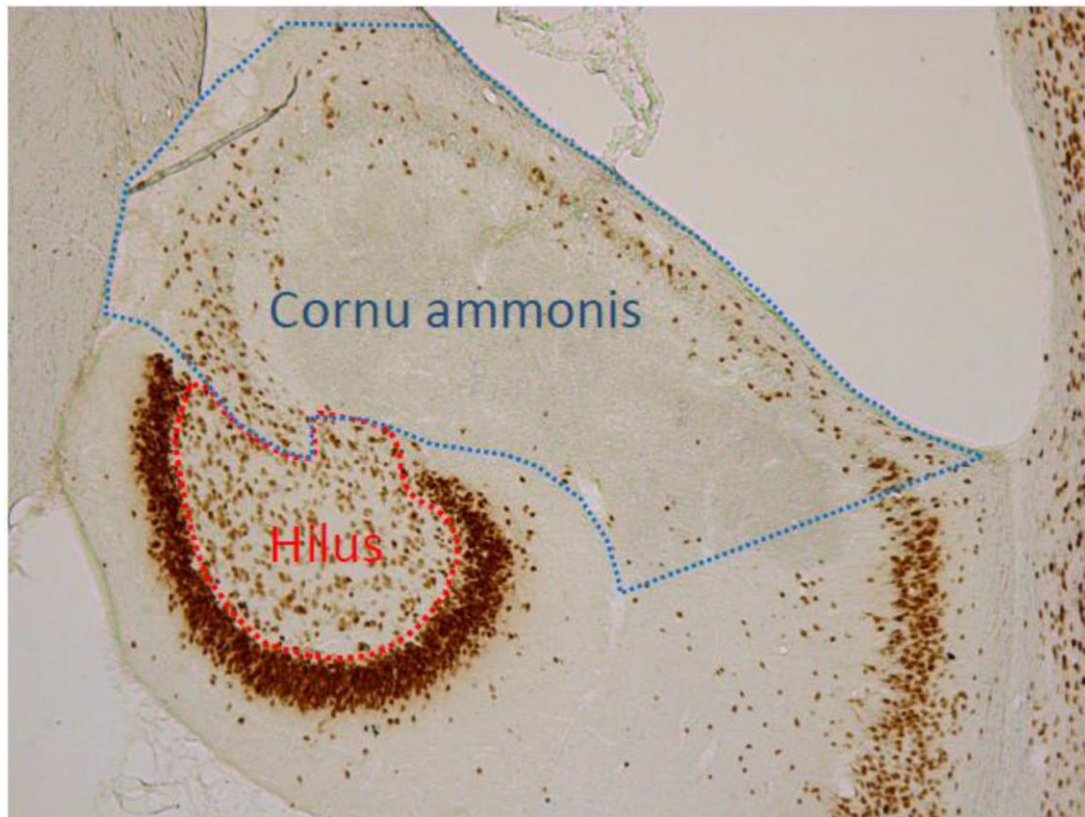


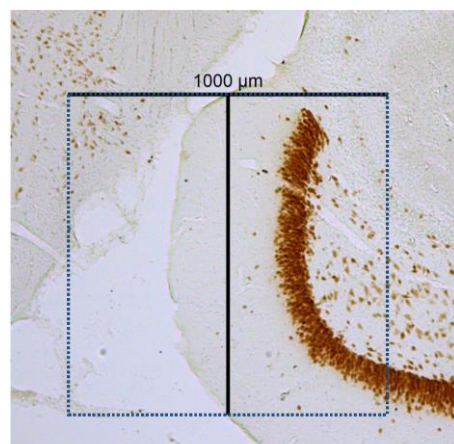
Abbildung 21: Umrandung der Teilgebiete des Hippocampus

In fünffacher Vergrößerung abgebildeter, mit NeuN immunhistochemisch angefärbter Schnitt des rechten Hippocampus von Versuchstier Nr. 28. Es handelt sich um ein Tier der Kontrollgruppe (scheinbare Durchtrennung) mit ausgeprägter HS. Die Außengrenzen des Hilus (rot) und des CA (blau) sind im Bild farblich umrandet. Die Fläche der so umrandeten Areale wurde mit der Messfunktion von Image J ermittelt. Anschließend erfolgte die Zählung aller kernhaltigen Zellen innerhalb der umrandeten Gebiete. [Eigene Abbildung]

Die ermittelten Flächen wurden in mm^2 angegeben, indem sie durch die Fläche eines $1 \times 1 \text{ mm}$ großen Kalibrierungskästchens geteilt wurden (Abbildung 22).

Abbildung 22: Kalibrierungskästchen (2)

In fünffacher Vergrößerung abgebildetes 1 mm^2 großes Kalibrierungskästchen, welches für die Bestimmung des Abbildungsmaßstabes der mit Image J errechneten Fläche des Hilus / CA verwendet wurde. Die mit dem Messwerkzeug durch Umrandung des Hilus / CA ermittelte Fläche wurde durch die Fläche dieses Kästchens geteilt und so in mm^2 umgerechnet. [Eigene Abbildung]



Es wurden alle immunpositiven Neuronen mit sichtbarem Zellkern innerhalb der umrandeten Regionen gezählt. Im Hilus wurden nur Neuronen gezählt, deren Somata keinen Kontakt zur Körnerzellschicht des GD aufwiesen und die sich außerhalb der Molekular- und Pyramidenzellschicht des Gebietes CA3 befanden. Im CA wurden alle, sich außerhalb des GD und des Subiculum befindenden Neuronen des Hippocampus mit sichtbarem Zellkern gezählt. Die Grenze des CA zum Subiculum konnte bei allen Tieren durch die Verbreiterung der Pyramidenzellschicht (Lamina II) und einen zunehmenden Abstand zwischen den einzelnen Pyramidenzellen eindeutig identifiziert werden (van Strien et al. 2009). Die Neuronenzählungen erfolgten manuell mit Unterstützung durch das für Image J konzipierte Plug-In „cell counter“ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>; Abbildung 23). Zur Errechnung der Neuronenzahl / mm² wurde die Anzahl der gezählten Neuronen einer Region durch die Fläche dieser Region in mm² geteilt.

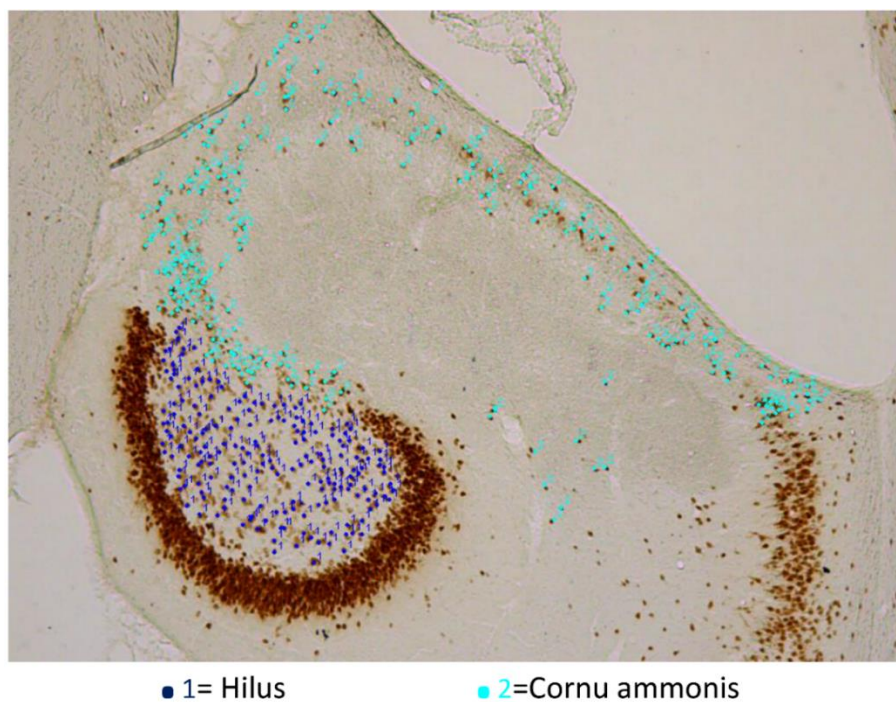


Abbildung 23: Neuronenzählung

In fünffacher Vergrößerung abgebildeter, mit NeuN immunhistochemisch angefarbter Schnitt des rechten Hippocampus von Versuchstier Nr. 28. Es handelt sich um ein Tier der Kontrollgruppe (scheinbare Durchtrennung) mit ausgeprägter HS. Der dargestellte Screenshot wurde während der Neuronenzählung mit dem „cell counting“ Plug-in für Image J aufgenommen. Die kernhaltigen Neuronen des Hilus ohne Kontakt zur Körnerzellschicht des GD oder zur Molekular- oder Pyramidenzellschicht von CA3 sind mit einem dunkelblauen Punkt und einer 1 markiert. Die kernhaltigen Neuronen des CA sind mit einem türkisen Punkt und einer 2 gekennzeichnet. Die Neuronen wurden manuell markiert, der Zählvorgang erfolgte durch das Plug-In. Anschließend wurden die gezählten Neuronen pro Areal durch die Fläche desselben Areals in mm² geteilt um die Neuronenzahl in Neuronen / mm² zu ermitteln. Um das übermäßige Zählen von Neuronen mit größeren Zellkernen auszugleichen, wurde Abercrombies Korrekturmethode angewandt. [Eigene Abbildung]

Da es durch eine zwischen zwei Gruppen variierende Zellkerngröße zur Ermittlung einer zu hohen Zellzahl in einer Gruppe kommen kann (Abercrombie 1946), wurde in jedem Schnitt der Durchmesser von vier Zellkernen erfasst und Abercrombies Korrekturmethode angewandt (Abercrombie 1946). Hierzu wurde die Zahl der Neuronen mit sichtbarem Zellkern pro mm² mit der Schnittdicke multipliziert und durch die Schnittdicke, addiert mit dem durchschnittlichen Durchmesser der Zellkerne, dividiert. Dies entspricht der Formel:

$$N = n * \frac{t}{(t + d)}$$

Hierbei ist N der wahre Wert der Zellzahl pro Fläche, n ist die beobachtete Zellzahl pro Fläche, t ist die Schnittdicke und d ist der Durchmesser des gezählten Objektes (Abercrombie 1946). Insgesamt sollten die mit dieser Methode ermittelten Neuronenzahlen als Annäherungen an den wahren Wert der Neuronenzahl und nicht als absolute Werte aufgefasst werden.

6.10 Verifizierung der Tractus perforans Durchtrennung

Um die korrekte Durchführung der TPD zu verifiziert, erfolgte unmittelbar vor der Perfusionsfixierung eine elektrophysiologische Untersuchung der Versuchstiere. Hierzu wurden erneut Ableitungs- und Stimulationselektroden auf die zuvor beschriebene Weise implantiert. Während der Feinjustierung der Ableitungselektroden wurde dann überprüft ob es möglich ist, durch eine TPS die oben beschriebenen typischen Körnerzellpotentiale (Abbildung 10) zu evozieren.

Infolge einer kompletten Durchtrennung von Axonen kommt es innerhalb weniger Tagen zu einer axonalen Degeneration distal der Verletzung (Waller 1850; Hjorth-Simonsen und Jeune 1972; Wang et al. 2012). Somit sind die Fasern des TP distal des Läsionsortes 10 Wochen nach einer korrekt durchgeführten TPD degeneriert und können weder Aktionspotentiale generieren noch weiterleiten. Eine TPS evoziert daher bei korrekt durchgeführter TPD kein typisches Körnerzellpotential mit EPSP und PS (Abbildung 10) mehr.

Diese Überlegung wurde bei der elektrophysiologischen Untersuchung ausgenutzt um zu überprüfen ob die TPD vollständig war. Nach der Positionierung der Ableitungs- und Stimulationselektroden wurde mit einer Frequenz von 0.5 Hz und einer Amplitude

von 10-20V stimuliert und die Eindringtiefe der Ableitungselektroden so lange variiert, bis ein typisches Körnerzellpotential abgeleitet wurde, oder in jeder möglichen Position der Ableitungselektroden keine typischen Körnerzellpotentiale ableitbar waren. Konnte bei Tieren der TPD-Gruppe beidseits kein typisches Körnerzellpotential abgeleitet werden, galt die TPD als komplett. Wurde bei Tieren der TPD-Gruppe ein typisches Körnerzellpotential evoziert und abgeleitet, wurden die Tiere von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Ergänzend zur elektrophysiologischen Verifizierung der TPD erfolgte eine histologische Analyse. Hierbei wurden mit Nissel gefärbte histologische Schnitte der Versuchstiere analysiert und der Schnittverlauf der TPD im Gewebe nachvollzogen. Bei einem Abweichen vom typischen Schnittverlauf wurden die Tiere von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

6.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit BIAS (Version 10.12; Epsilon-Verlag GbR). Einige Versuchsdaten erwiesen sich bei der Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung als nicht normalverteilt, sodass statistische Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test ermittelt wurden. Ein Signifikanzniveau α von 5% wurde als Grenzwert festgelegt. Ein errechneter p-Wert <0.05 galt somit als signifikant.

Die Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Grafiken erfolgt unter Verwendung von Excel 2013 für Windows (Microsoft Corporation), Powerpoint 2013 für Windows (Microsoft Corporation) und dem yED Graph Editor (yWorks GmbH). Die Ergebnisse werden im Text als arithmetisches Mittel \pm einer Standardabweichung angegeben. Einige Ergebnisse werden als Box-Whisker-Plot dargestellt. In den Box-Whisker-Plot Grafiken ist der Median als Strich gekennzeichnet, die Boxen reichen vom oberen zum unteren Quartil und beinhalten somit 50% der Daten. Die Antennen (Whisker) geben den maximalen und den minimalen Wert an. Die Erstellung der Box-Whisker-Plots erfolgte mit Excel 2013 für Windows.

6.12 Verwendete Geräte, Substanzen und Software

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Geräte, Materialien und Instrumente	Hersteller / Bezugsquelle
Plexiglaskäfige	Feinmechanik Werkstatt; Physiologisches Institut der Phillips-Universität Marburg
Stereotaxierahmen (Modell 900)	David Kopf Instruments; Tujunga; USA
Stereotaxiearme (Modell 960)	David Kopf Instruments; Tujunga; USA
Skalpelli (Art. Nr.: 10007-12 + 10022-00)	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
Arterienklemmen (Baby-Mixer Hemostat - Curved, Art. Nr.: 13013-14)	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
Dentalbohrer (H30 Handpiece)	Foredom; Bethel; USA
Bohrkopf (Diamant Schleifstift Kugelform, Ø 1mm, Art. Nr.: 28212)	Proxxon; Föhren; Deutschland
Stimulationselektroden (Nex-200)	Rhodes Medical Instruments; Summerland; USA
Ableitungselektroden (Art. Nr.: 7910)	A-M Systems; Carlsborg; USA
Stimulator (S88)	Grass Instruments; West Warwick; USA
Verstärker (Model 440 Instrumentation Amplifier)	Brownlee Precision; San Jose; USA
Empfänger (PowerLab 16/35)	AD Instruments; Mountain View; USA
Laborcomputer (MacBook)	Apple; Cupertino; USA
Anschlussbuchse	Ginder Scientific; Ottawa; Kanada
Klammergerät (Reflex 7mm Clip Applier)	Cellpoint Scientific Inc.; Gaithersburg; USA
Stimulationskäfige	Feinmechanik Werkstatt; Physiologisches Institut der Phillips-Universität Marburg
Mikromesser (Halbmondförmige Klinge Art. Nr. 1031714)	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
Infrarotkamera (AirCam OD-325HD)	Airlive Company; New Taipei City; Taiwan
Schere (Utility Scissor, Art. Nr.: 37500-00)	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
Kryotom (CM3050 S Kryostat)	Leica; Wetzlar; Deutschland
Adhäsionsobjektträger (Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides)	Fisher Scientific; Pittsburgh; USA
Mikroskop (DM4000 BLED)	Leica; Wetzlar; Deutschland
Mikroskop Kamera (DFC 295)	Leica; Wetzlar; Deutschland
Kamera (Cyber-shot DSC-WX350)	Sony; Tokio; Japan

Tabelle 4: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller / Bezugsquelle
Ketamin (Ketaminhydrochlorid, Ketamin Inresa)	Inresa Arzneimittel GmbH; Freiburg; Deutschland
Xylazin (Xylazinhydrochlorid, Rompun® 2%)	Bayer Vital GmbH; Leverkusen; Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH; Leverkusen; Deutschland
Desinfektionsmittel (Kodan®, Tinktur forte farblos)	Schülke; Norderstedt; Deutschland
Zahnzement (Paladur®)	Heraeus Kulzer; Hanau; Deutschland
Kochsalzlösung (0.9%)	Im Labor selbst gefertigt
Gentamicin (Gentamicin 50 mg/mL, Art. Nr.: G1397)	Sigma-Aldrich; München; Deutschland
Isofluran (Forene®)	AbbVie; Deutschland; Ludwigshafen
Paraformaldehyd	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Phosphatpuffer	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Saccharoselösung 30%	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Trockeneis	Apotheke; UKGM; Marburg; Deutschland
Ethanol	Otto Fischar GmbH; Saarbrücken; Deutschland
Kresylviolett (0.01%) (Certistain)	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Normales Eselserum (S30)	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Maus-anti-NeuN (MAB377)	Chemicon; Temecula; USA
biotyniliertes sekundärer Antikörper (Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody BA-9200)	Vector; Burlingame; USA
Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase Komplex (Vectastatin Elite ABC Kit PK-6100)	Vector; Burlingame; USA
3,3'-Diaminobenzidine (Prod. Nr.:32741)	Sigma-Aldrich; München; Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller / Bezugsquelle
Scope	AD Instruments; Mountain View; USA
LabChartPro	AD Instruments; Mountain View; USA
SecuritySpy	Ben Software; London; Großbritannien
Adobe Photoshop CS5	Adobe; San Jose; USA
Image J	open source software; (http://imagej.nih.gov/ij)
cell counter Plug-In für Image J	open source software; (http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html)
BIAS	epsilon-Verlag GbR; Darmstadt; Deutschland
Excel 2013 für Windows	Microsoft Corporation; Redmond; USA
Powerpoint 2013 für Windows	Microsoft Corporation; Redmond; USA
yED Graph Editor	yWorks GmbH; Tübingen; Deutschland

7 Ergebnisse

7.1 Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilungen

Die Versuche wurden an insgesamt 53 männlichen Sprague–Dawley-Ratten durchgeführt. Von diesen 53 Tieren erhielten 43 (81%) die komplette TPS (30`/30`/8h). Die 10 restlichen Tiere (19%) erhielten nicht alle Stimulationen, da sie ihre „Elektrodenkappen“ vor oder während der Stimulationen verloren haben. Die 43 Versuchstiere mit vollständiger TPS wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. Bei 18 von 43 Tieren (42%) wurde eine TPD durchgeführt, diese Gruppe von Versuchstieren wird TPD-Gruppe genannt. Bei 25 von 43 Tieren (58%) wurde eine scheinbare TPD durchgeführt, diese Gruppe wird Kontrollgruppe genannt.

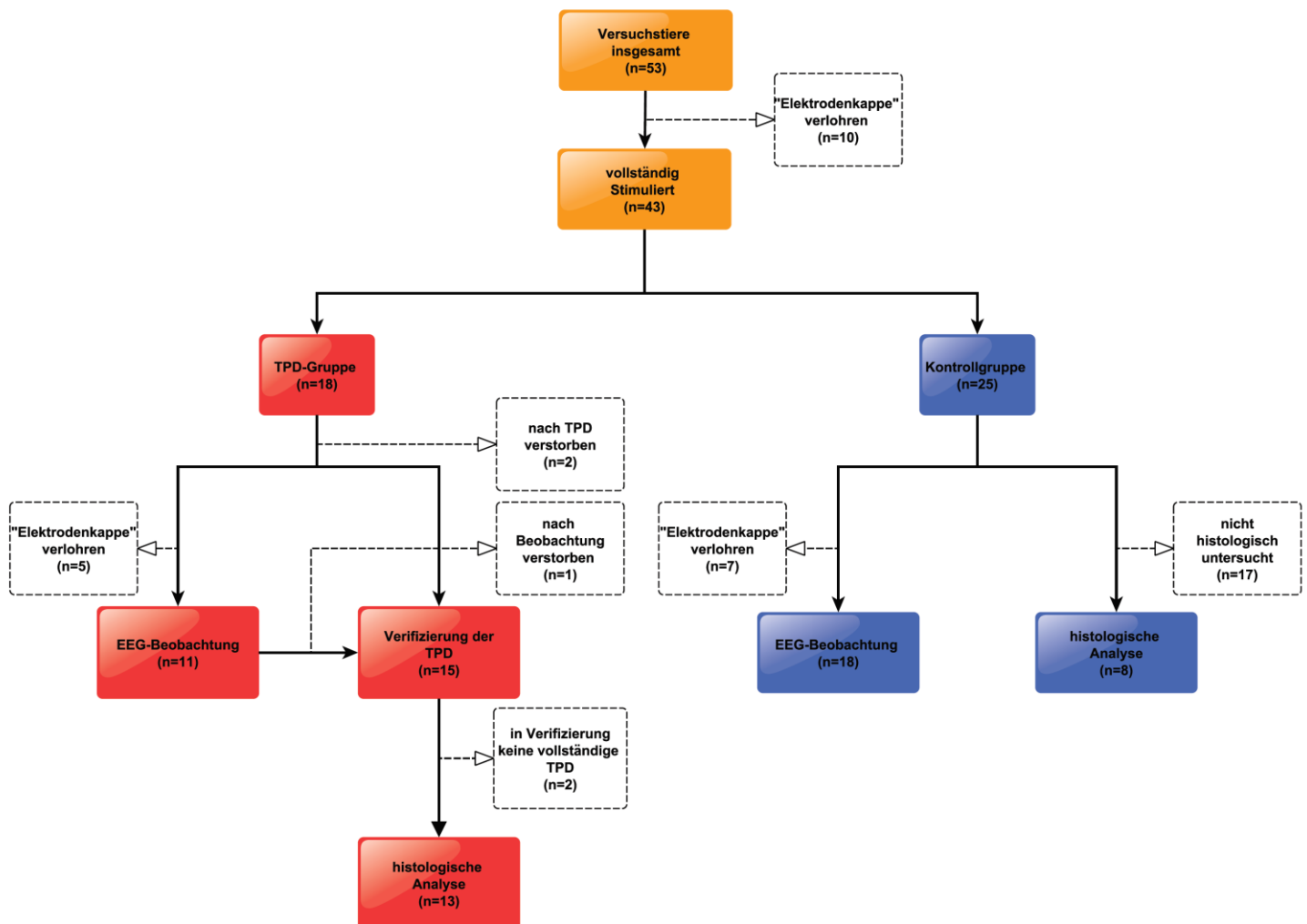


Abbildung 24: Versuchsaufbau

Darstellung des Versuchsaufbaus mit Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen TPD-Gruppe (**rot**) und Kontrollgruppe (**blau**). Die einzelnen Versuchsschritte mit der Anzahl der jeweils einbezogenen Tiere sind angegeben. Drop-outs werden in den gestrichelten Kästchen mit Angabe der Ursache gekennzeichnet. [Eigene Abbildung]

Von den 43 Tieren mit vollständiger Stimulation wurden insgesamt 29 (67%) EEG-beobachtet. In der TPD-Gruppe wurden 11 von 18 Tieren (61%) EEG-beobachtet. Von den 7 Tieren, die nicht EEG-beobachtet werden konnten, haben 5 ihre „Elektrodenkappen“ verloren und 2 sind vor Beobachtungsbeginn verstorben. Eines der verstorbenen Tiere erlitt während der TPD eine nicht stillbare Hirnblutung, das zweite verstarb 3 Tage nach der Durchtrennung ohne erkennbare Ursache. 18 von 25 Tieren der Kontrollgruppe (72%) wurden EEG-beobachtet. Die 7 Tiere ohne EEG-Beobachtung haben alle zuvor ihre „Elektrodenkappen“ verloren (Abbildung 24).

Von den 43 Versuchstieren mit vollständiger TPS wurden insgesamt 23 (54%) histologisch untersucht. 15 von 18 Tieren der TPD-Gruppe (83%) wurden histologisch untersucht. Die 3 Tiere ohne histologische Untersuchung sind zuvor verstorben. 8 der 25 Tiere der Kontrollgruppe (32%) wurden histologisch untersucht. Die verbleibenden 17 Tiere der Kontrollgruppe wurden nicht histologisch untersucht, da bereits eine ausreichende Anzahl von histologischen Kontrollen bestand.

Bei allen histologisch untersuchten Versuchstieren erfolgte zunächst eine elektrophysiologische Untersuchung zur Verifizierung der korrekten Durchführung der TPD. Bei Tieren der TPD-Gruppe (n=15) wurde die Durchtrennung zusätzlich histologisch analysiert (Abbildung 24).

7.2 Verifizierung der Tractus perforans Durchtrennung

7.2.1 Elektrophysiologische Untersuchung

Bei Insgesamt 23 Versuchstieren erfolgte die elektrophysiologische Untersuchung der Leitfähigkeit des TP. 15 von 18 Tieren der TPD-Gruppe (83%) wurden elektrophysiologisch untersucht, die 3 restlichen Tiere sind zuvor verstorben. In der TPD-Gruppe (n=15) konnten bei 14 (93%) Versuchstieren keine typischen Körnerzellpotentiale durch eine TPS evoziert werden. Bei einem Tier der TPD-Gruppe (7%) evozierte die TPS ein EPSP in der Körnerzellschicht des GD. Dieses Tier wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei allen Tieren der Kontrollgruppe (n=8) evozierte die TPS ein EPSP mit PS in der Körnerzellschicht des ipsilateralen GD (Abbildung 25).

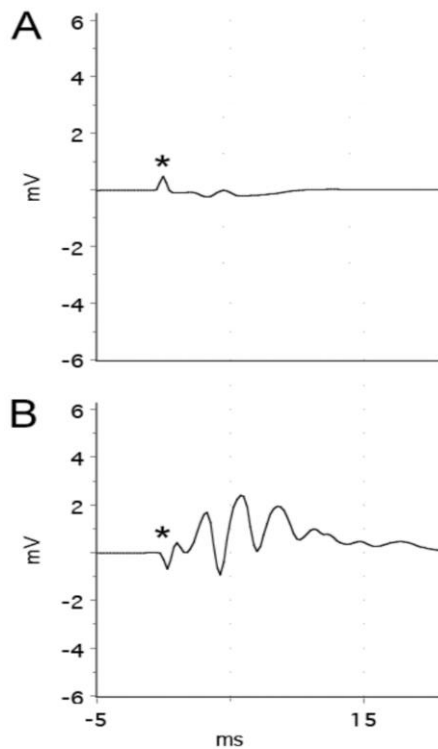


Abbildung 25: Elektrophysiologische Verifizierung der TPD

Darstellung der Feldpotentiale im GD bei beidseitiger TPS unmittelbar vor der Perfusionsfixierung der Versuchstiere. Die Spitzen der Stimulationselektroden befinden sich im Verlauf des TP, die Ableitungselektroden befinden sich beidseits im GD. Es werden repräsentative Feldpotentiale dargestellt, welche durch eine ipsilaterale TPS mit 0.2Hz im GD evoziert wurden. Die dargestellten Feldpotentiale entsprechen dem Mittelwert von 10 Reizantworten. **A:** Feldpotentiale des linken GD von Ratte Nr. 15 (TPD-Gruppe). Bei einer 0.2Hz TPS wird im GD ein unspezifisches Stimulationsartefakt (**Sternchen**) ausgelöst. Nach dem Stimulationsartefakt kann man nur kleine Wellenformen beobachten, welche weder einem positiven EPSP noch einem negativen PS entsprechen. Dieses Ausbleiben von evozierten Potentialen ist repräsentativ für alle Tiere mit vollständiger TPD. **B:** Feldpotentiale des rechten GD von Ratte Nr. 30 (Kontrollgruppe). Eine TPS mit 0.2Hz erzeugt auch bei diesem Tier ein unspezifisches Stimulationsartefakt (**Sternchen**). Kurz danach wird eine komplexe große Wellenform evoziert. Diese besteht aus einem positiven EPSP und mehreren negativen PS. Diese evozierten Potentiale sind repräsentativ für alle Tiere ohne TPD, sowie für Versuchstier Nr. 22, dessen TPD inkomplett war. [Eigene Abbildung]

7.2.2 Histologische Analyse der Durchtrennung

Bei insgesamt 15 der 18 Tiere der TPD-Gruppe (83%) wurde die TPD histologisch evaluiert, die 3 restlichen Tiere sind zuvor verstorben. Die histologische Evaluation ergab, dass der TP von 13 Tieren (87%) beidseits vollständig durchtrennt wurde. Bei zwei Tieren stellte sich die Durchtrennung als unvollständig dar. Das Tier, welches schon in der elektrophysiologischen Untersuchung von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde, wies einseitig nur eine oberflächliche TPD auf. Bei dem zweiten Tier hatte die Durchtrennung linksseitig nicht den TP, sondern den kompletten Hippocampus zerstört. Somit konnten die Ableitungselektroden nicht in der Körnerzellschicht des GD positioniert werden, was erklärt, warum in der elektrophysiologischen Untersuchung keine typischen Körnerzellpotentiale ableitbar waren (Abbildung 26). Diese beiden Tiere wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



Abbildung 26: Histologische Verifizierung der TPD

Zwei in 1.6-facher Vergrößerung abfotografierte, mit Nissel gefärbte Schnitte. A: Linker Hippocampus von Versuchstier Nr. 13. Bei dieser Ratte ist eine vollständige TPD ersichtlich. Der Verlauf der Durchtrennung wird durch die **schwarzen Pfeile** gekennzeichnet. Bei diesem Versuchstier besteht keine klassische HS, es kam nur zu einer mäßig ausgeprägten Atrophie des Hippocampus B: Linker Hippocampus von Versuchstier Nr. 7. Bei dieser Ratte erfolgte die Durchtrennung zu weit rostral, sodass anstelle des TP der kaudale Anteil des GD durchtrennt wurde (**schwarze Pfeile**). Dieses Versuchstier wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen. [Eigene Abbildung]

7.3 Beobachtung der Versuchstiere

Insgesamt 29 Versuchstiere wurden EEG-beobachtet, 11 Tiere der TPD-Gruppe und 18 Kontrollen. Insgesamt betrug die kumulative Beobachtungszeit der Tiere beider Gruppen über 4000h.

Da die „Elektrodenkappe“ während der EEG-Beobachtung über das Ableitungskabel fest mit der Decke des Käfigs verbunden ist, reißt die „Elektrodenkappe“ bei ruckartigen Bewegungen der Tiere (z.B. während epileptischen Anfällen) leichter aus. Somit kam es unter Beobachtungsbedingungen zu einer erhöhten Rate von Tieren, die ihre „Elektrodenkappe“ verloren haben. Dies führte zu einer hohen Variabilität des Beobachtungszeitraums.

Die Versuchstiere wurden im Durchschnitt 5.9 ± 4.3 Tage beobachtet (TPD-Gruppe 6.1 ± 3.7 Tage; Kontrollgruppe 5.8 ± 4.6 Tage). Ein Tier wurde über den geplanten Zeitraum von 18 Tagen beobachtet (4%), 8 Tiere (28%) wurden über 7-17 Tage beobachtet, 16 Tiere (55%) über 1-7 Tage und 4 Tiere (13%) über einen Zeitraum von unter einem Tag (Abbildung 27). In allen Fällen war ein Verlust der „Elektrodenkappe“ der Grund für die vorzeitige Beendigung der elektrophysiologischen Beobachtungen.

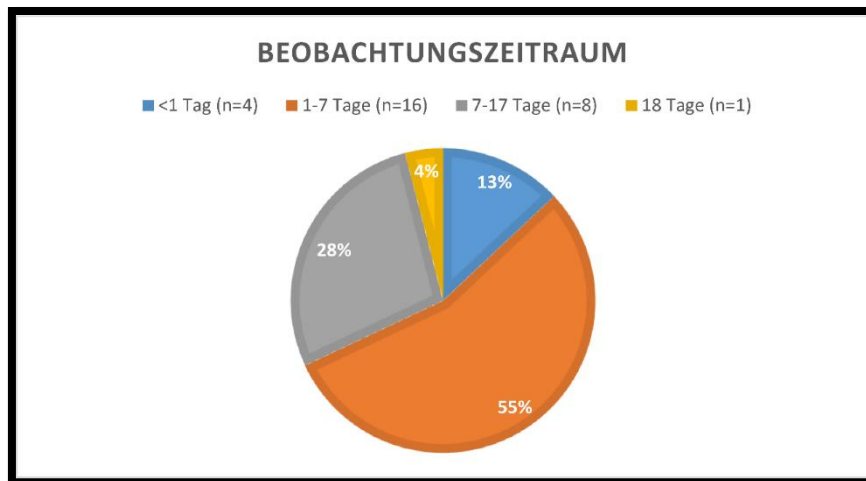


Abbildung 27: Beobachtungszeitraum

*Darstellung des Beobachtungszeitraums aller beobachteten Versuchstiere. Der Beobachtungszeitraum wird in vier Gruppen eingeteilt: 1. Unter einem Tag (**blau**); 2. 1-7 Tage (**orange**); 3. 7-17 Tage (**grau**); 4. 18 Tage (**gelb**). Der prozentuale Anteil jeder Gruppe an der Gesamtheit aller beobachteter Versuchstiere wird in einem Kreisdiagramm dargestellt. [Eigene Abbildung]*

Bei 20 der 29 (69%) beobachteten Versuchstiere wurde während des Beobachtungszeitraums, unabhängig von einer zuvor durchgeführten TPD, kein epileptischer Anfall aufgezeichnet. Hierbei war der Beobachtungszeitraum bei 4 Tieren (20%) kürzer als ein Tag, also sicherlich zu kurz, um eventuelle epileptische Anfälle aufzuzeichnen. 25% der Tiere (n=11) ohne aufgezeichnete epileptische Anfälle wurden über 1-7 Tage beobachtet. In dieser Gruppe von Versuchstieren lässt sich das spätere Auftreten epileptischer Anfälle nicht sicher ausschließen, da das längste Intervall zwischen zwei epileptischen Anfällen im Kainat-Tiermodell 8 Tage betrug (Williams et al. 2009b). Die restlichen 5 Tiere (25%) entwickelten während eines Beobachtungszeitraumes von über 10 Tagen keine epileptischen Anfälle. Obwohl eine Epilepsie auch durch einen anfallsfreien Zeitraum von über 10 Tagen nicht sicher ausgeschlossen werden kann, ist die Entstehung epileptischer Anfälle zu einem späteren Zeitpunkt bei dieser Gruppe von Versuchstieren sehr unwahrscheinlich. Daher wird angenommen, dass es bei diesen 5 Versuchstieren (TPD-Gruppe n=2; Kontrollgruppe n=3) trotz vollständiger TPS nicht zur Entwicklung einer Epilepsie kam (Tabelle 6).

Tabelle 6: Beobachtete Versuchstiere ohne epileptische Anfälle

Ratte Nr.	Gruppe	Beobachtungszeitraum (Tage)
1	TPD	5
10	TPD	6
13	TPD	11
16	TPD	7
18	TPD	<1
22	TPD	<1
24	TPD	11
25	Kontr.	2
33	Kontr.	<1
34	Kontr.	3
37	Kontr.	11
39	Kontr.	5
40	Kontr.	4
41	Kontr.	13
42	Kontr.	2
43	Kontr.	4
46	Kontr.	5
49	Kontr.	<1
50	Kontr.	12
51	Kontr.	7

Tabellarische Darstellung aller beobachteten Versuchstiere, bei denen keine epileptischen Anfälle aufgezeichnet wurden. Sowohl in der TPD- als auch in der Kontrollgruppe wurden bei einigen Versuchstieren keine epileptischen Anfälle aufgezeichnet, die über einen Zeitraum von über zehn Tagen beobachtet wurden. Daher scheint, unabhängig von einer zuvor durchgeführten TPD, eine Anfallsfreiheit einiger Tiere im NKTPS-Tiermodell zu bestehen.

7.3.1 Epileptische Anfälle

Während der Beobachtung der Versuchstiere wurden 26 epileptische Anfälle aufgezeichnet. Es wurden 9 epileptische Anfälle von 4 verschiedenen Tieren der TPD-Gruppe (n=11) und 17 epileptische Anfälle von 5 verschiedenen Tieren der Kontrollgruppe (n=18) aufgezeichnet.

Die epileptischen Anfälle waren alle durch eine Veränderung der Amplitude und Frequenz der Körnerzellaktivität gekennzeichnet, welche sich grundlegend von der interiktalen Grundaktivität unterschied. Diese Veränderung persistierte über mehr als 10s und erfüllten die von Bragin et al. im Tiermodell verwendeten Kriterien für die elektroenzephalographische Definition eines epileptischen Anfalls (Bragin et al. 2005, S. 1593). Zusätzlich ergab eine Analyse des Videomaterials, dass es bei allen Anfällen zu klinischen Entäußerungen der Tiere kam. Es kam somit bei jedem der 26 epileptischen Anfälle zu (objektivierbaren) Symptomen, wodurch zusätzlich die Definitionskriterien eines epileptischen Anfalls der ILAE erfüllt waren (Fisher et al. 2005, S. 471).

7.3.2 Dauer der Latenzzeit

Der erste epileptische Anfall trat durchschnittlich 16.1 ± 1.9 Tage nach dem Abschluss der TPS auf ($n=9$). Die durchschnittliche Dauer der Latenzzeit betrug in der TPD-Gruppe ($n=4$) 15.3 ± 1.5 Tage und in der Kontrollgruppe ($n=5$) 16.8 ± 1.9 Tage. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p>0.05$). Während des ersten beobachteten epileptischen Anfalls wurden im gleichzeitig durchgeführten Videomonitoring stets klinische Entäußerungen der Versuchstiere aufgezeichnet. Somit konnte die im Kainat-Tiermodell beschriebene Beobachtung, dass vor jedem „konvulsivem“ epileptischem Anfall ein „nicht-konvulsiver“ epileptischer Anfall (also ein im EEG detektierter Anfall ohne klinische Entäußerungen) auftritt (Dudek und Staley 2011, S. 242; Williams et al. 2009a), nicht reproduziert werden (Tabelle 7, Abbildung 28).

Tabelle 7: Latenzzeit in Tagen (d).

Ratte Nr.	Gruppe	Latenz (d)
3	TPD	16
11	TPD	13
12	TPD	17
15	TPD	15
36	Kontr.	18
44	Kontr.	15
47	Kontr.	14
52	Kontr.	18
53	Kontr.	19

tiere aufgezeichnet. Somit konnte die im Kainat-Tiermodell beschriebene Beobachtung, dass vor jedem „konvulsivem“ epileptischem Anfall ein „nicht-konvulsiver“ epileptischer Anfall (also ein im EEG detektierter Anfall ohne klinische Entäußerungen) auftritt (Dudek und Staley 2011, S. 242; Williams et al. 2009a), nicht reproduziert werden (Tabelle 7, Abbildung 28).

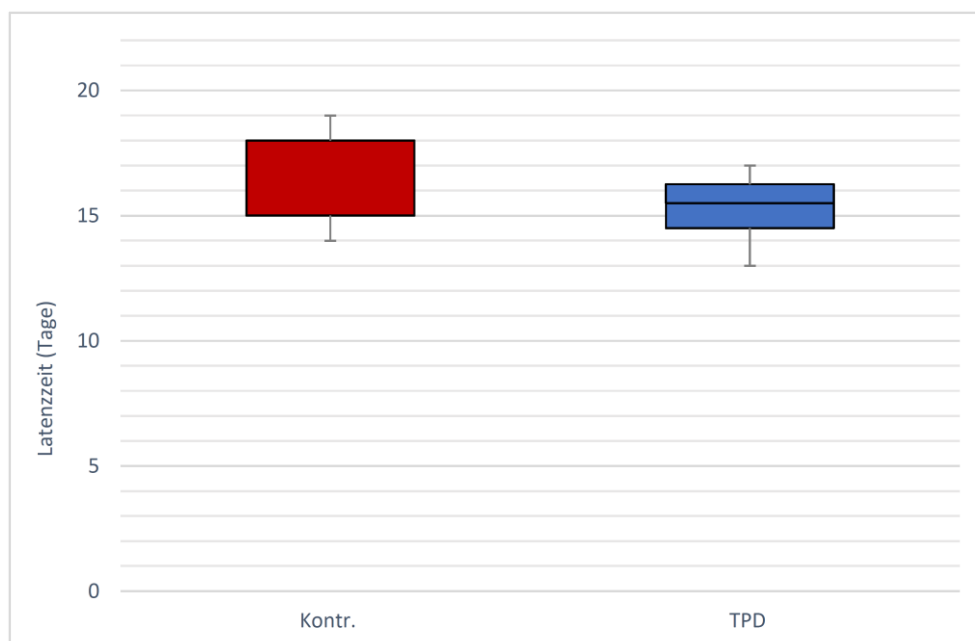


Abbildung 28: Latenzzeit

Graphische Darstellung der Latenzzeit, zwischen dem Abschluss der TPS und der Beobachtung des ersten spontanen epileptischen Anfalls. Die Y-Achse gibt die Zeit in Tagen an, die X-Achse die Gruppenzugehörigkeit. Die Boxplots entsprechen dem Interquartilenabstand. Der Median wird als Strich angegeben, wobei der Median in der Kontrollgruppe identisch mit dem oberen Quartil ist. Die Antennen geben die minimal / maximal gemessene Zeit an. Es bestand kein signifikanter Unterschied der Latenzzeit zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p>0.05$). [Eigene Abbildung]

7.3.3 Anfallslänge

Die Bestimmung der Anfallslänge erfolgte durch die Analyse der während der epileptischen Anfälle abgeleiteten Körnerzellaktivität. Als Anfallsbeginn wurde der Zeitpunkt definiert, ab dem es zu einer Veränderung der Körnerzellaktivität kam, welche sich von der Grundaktivität unterscheidet (Bragin et al. 2005; Bower und Buckmaster 2008, S. 2435). Als Anfallsende wurde der Zeitpunkt definiert, ab dem die Amplitude und Frequenz der Körnerzellaktivität wieder gleich oder geringer als die präiktale Grundaktivität war. Postiktal kam es teilweise zu einer Depression der Körnerzellaktivität (Abbildung 29).

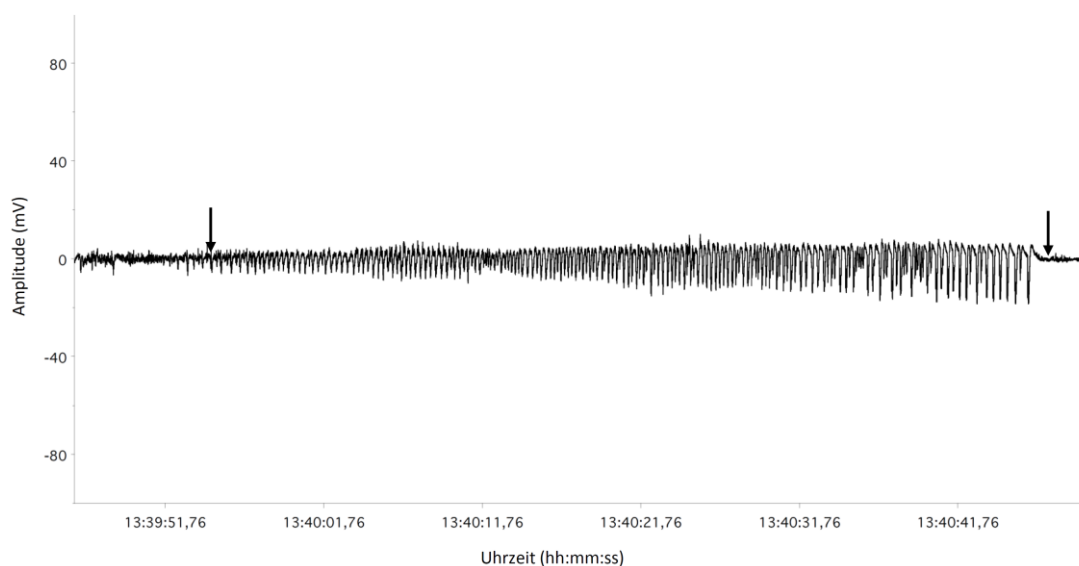


Abbildung 29: Ermittlung der Anfallslänge

Abgeleitete Körnerzellaktivität von Versuchstier Nr. 3 (TPD-Gruppe) während des zweiten beobachteten epileptischen Anfalls. Auf der Y-Achse wird die Amplitude der abgeleiteten Körnerzellaktivität in mV angegeben, auf der X-Achse die Uhrzeit. Der Anfallsbeginn und das Anfallsende sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Anfallslänge beträgt 54s. Am Anfallsbeginn sieht man eine erhöhte Amplitude bei sinkender Frequenz der abgeleiteten Potentiale. Die Amplitude der Körnerzellpotentiale ist im Verlauf des epileptischen Anfalls progredient und erreicht ihr Maximum kurz vor dem Anfallsende. Die Frequenz der Körnerzellpotentiale sinkt vor dem Anfallsende ab. Das Anfallsende tritt abrupt ein. Postiktal ist die Amplitude der Körnerzellaktivität geringer als die präiktale Grundaktivität. [Eigene Abbildung]

Die 26 aufgezeichneten epileptischen Anfälle waren durchschnittlich 81 ± 29 s lang ($n=26$). Die durchschnittliche Anfallslänge von Tieren mit TPD betrug 87 ± 28 s ($n=9$), die von Tieren der Kontrollgruppe 77 ± 29 s ($n=17$). Es zeigt sich statistisch kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 8; Abbildung 29; Abbildung 30).

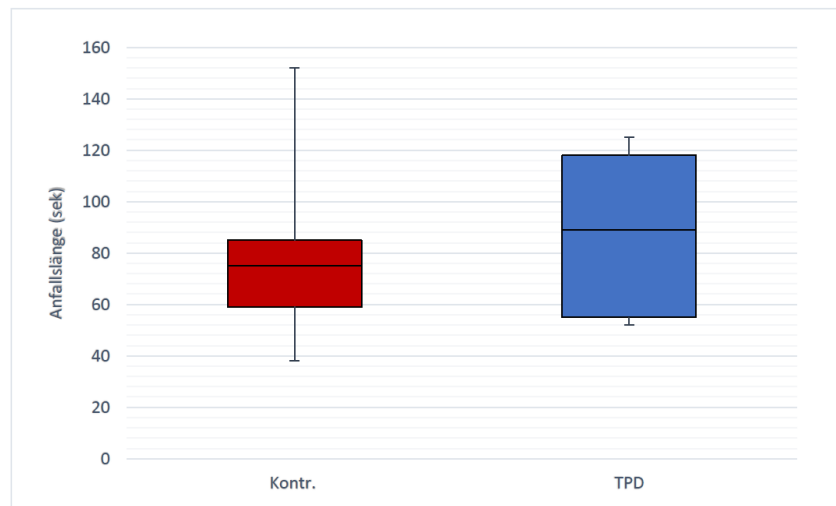


Abbildung 30: Anfallslänge

Graphische Darstellung der durchschnittlichen Anfallslänge in Sekunden. Auf der Y-Achse wird die Anfallslänge in Sekunden angegeben, auf der X-Achse die Gruppenzugehörigkeit. Die Boxplots entsprechen dem Interquartilenabstand. Der Median wird als Strich angegeben. Die Antennen geben die minimal / maximal gemessene Anfallslänge an. Die Anfallslänge wurde anhand der abgeleiteten Körnerzellaktivität bestimmt. Es bestand kein signifikanter Unterschied der Anfallslänge zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p > 0.05$). [Eigene Abbildung]

Tabelle 8: Länge und Schwere der epileptischen Anfälle

Ratte Nr.	Gruppe	Anfallslänge (sec)	Anfallsschwere (Racine Scala)
3	TPD	89	4
3	TPD	54	2
3	TPD	55	5
11	TPD	102	4
12	TPD	118	3
15	TPD	52	2
15	TPD	70	2
15	TPD	118	4
15	TPD	125	4
36	Kontr.	96	4
36	Kontr.	113	5
36	Kontr.	65	3
36	Kontr.	44	4
36	Kontr.	38	5
36	Kontr.	81	5
36	Kontr.	67	2
36	Kontr.	55	2
36	Kontr.	118	5
44	Kontr.	40	3
47	Kontr.	152	4
47	Kontr.	77	5
47	Kontr.	75	2
47	Kontr.	73	4
52	Kontr.	85	4
53	Kontr.	77	4
53	Kontr.	59	2

Tabellarische Darstellung der Länge und Schwere aller beobachteten epileptischen Anfälle ($n=26$). Die Anfallslänge wurde anhand der abgeleiteten Körnerzellaktivität bestimmt. Die klinische Anfallsschwere wurde durch die Auswertung des Videomaterials bestimmt. Alle in den Körnerzellaufzeichnungen detektierten epileptischen Anfälle haben zu einer klinischen Reaktion der Versuchstiere geführt. Teilweise führte schon der erste aufgezeichnete epileptische Anfall zu schweren klinischen Symptomen (Racine 4-5).

Insgesamt gab es keine offensichtlichen Unterschiede in der Morphologie der Körnerzellpotentiale, welche während der beobachteten epileptischen Anfälle in beiden Gruppen abgeleitet wurden (Abbildung 31).

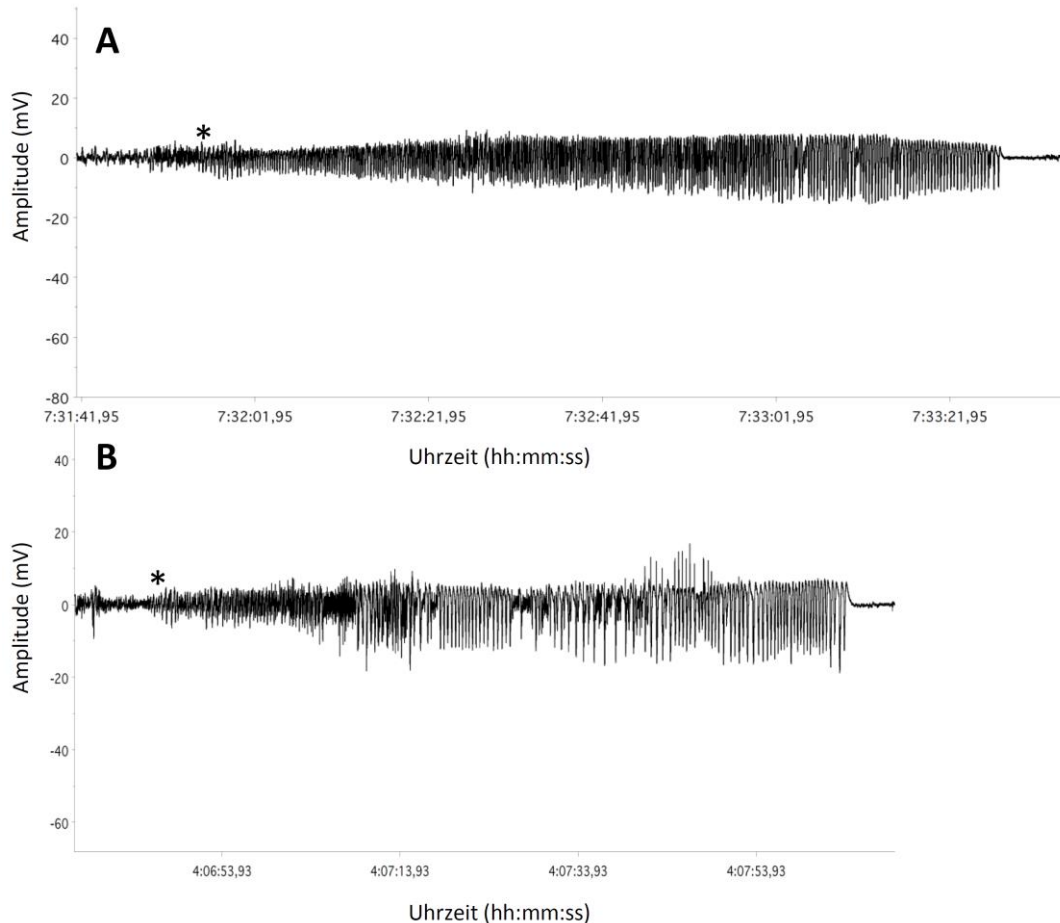


Abbildung 31: Körnerzellpotentiale während epileptischer Anfälle

Auf der Y-Achse wird die Amplitude der abgeleiteten Körnerzellaktivität in mV angegeben, auf der X-Achse die Uhrzeit. Der Anfallsbeginn ist mit einem **Sternchen** gekennzeichnet. **A:** Erster beobachteter epileptischer Anfall von Versuchstier Nr. 11 (TPD-Gruppe). Die gemessene Anfallsdauer beträgt 102s, der Anfall führte zu klinischen Entäußerungen der Stufe IV auf der Racine Scala. **B:** Sechster beobachteter epileptischer Anfall von Versuchstier Nr. 36 (Kontrollgruppe). Die gemessene Anfallsdauer beträgt 67s, der Anfall führte zu klinischen Entäußerungen der Stufe II auf der Racine Scala. Die Abbildungen verdeutlichen, dass die TPD keinen offensichtlichen Einfluss auf die Anfallsmorphologie in den Körnerzellableitungen hatte. Bei beiden Anfällen steigt die Amplitude der Körnerzellaktivität im Anfallsverlauf progredient an. Kurz vor der Beendigung der Anfallsaktivität kann man eine Verlangsamung der Frequenz beobachten. Postiktal ist die Amplitude der Körnerzellaktivität geringer als die präiktale Grundaktivität. [Eigene Abbildung]

7.3.4 Anfallsseminologie

Die Seminologie der 26 aufgezeichneten epileptischen Anfälle wurde durch die Analyse des Videomaterials ermittelt. Hierzu wurde bei einem in den Körnerzellableitungen detektiertem epileptischen Anfall das zeitgleich aufgenommene Videomaterial

analysiert. Die beobachteten klinischen Anfälle wurden anhand der Racine-Skala in fünf klinische Schweregrade eingeteilt (Tabelle 8). Alle aufgezeichneten Anfälle wiesen einen klinischen Schweregrad von II (repetitives Kopfnicken) bis V (tonisches Aufbäumen mit anschließendem Sturz) auf der Racine-Skala auf.

Der Median der Anfallsschwere beider Versuchsgruppen (TPD $n=9$; Kontr. $n=17$) betrug IV auf der Racine-Skala. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p>0.05$).

Eine Korrelation zwischen Anfallslänge und klinischer Anfallsschwere wurde nicht ermittelt. Allerdings kam es bei allen epileptischen Anfällen mit einer Länge über 80s ($n=11$) zur Ausbildung einer klonisch-tonischen-Anfallsseminologie (Racine-Skala \geq IV; Tabelle 8). Die Anfallsseminologie war bei allen beobachteten epileptischen Anfällen ähnlich. Die fünf Klassen der Racine-Skala liefen nacheinander ab (Abbildung 32; Tabelle 2). Je nach klinischem Schweregrad stoppte der Anfall auf einer bestimmten Klasse der Racine-Skala.

Die Dauer der Symptome der einzelnen Stufen variierte inter- und intraindividuell stark. Insgesamt gab es keine offensichtlichen Unterschiede in der Anfallsseminologie zwischen den Tieren mit TPD und den Tieren der Kontrollgruppe.

Durchschnittlich 33 ± 9 s nach dem Anfallsbeginn in den Körnerzelleableitungen kam es zur Ausbildung der ersten klinischen Symptome. In der TPD-Gruppe ($n=9$) betrug die Latenz zwischen elektroenzephalographischem und klinischem Anfallsbeginn 35 ± 5 s, in der Kontrollgruppe ($n=17$) 33 ± 10 s. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p>0.05$).

7.3.5 Interiktale Potentiale

In den vorherigen Versuchen mit dem NKTPS-Tiermodell wurden mit den in der Körnerzellschicht des GD liegenden Tiefenelektroden „interiktalen Potentiale“ aufgezeichnet, welche sowohl während der Latenzzeit als auch interiktal spontan auftraten. Diese spontanen „interiktalen Potentiale“ konnten durch eine Stimulation des TP reproduziert werden (Abbildung 4). Die Auftrittswahrscheinlichkeit dieser „interiktalen Potentiale“ wurde durch die TPD nicht beeinflusst (Meyer et al. 2016). Bei Tieren der TPD-Gruppe konnten die Potentiale sowohl während der Latenzzeit als auch interiktal aufgezeichnet werden.

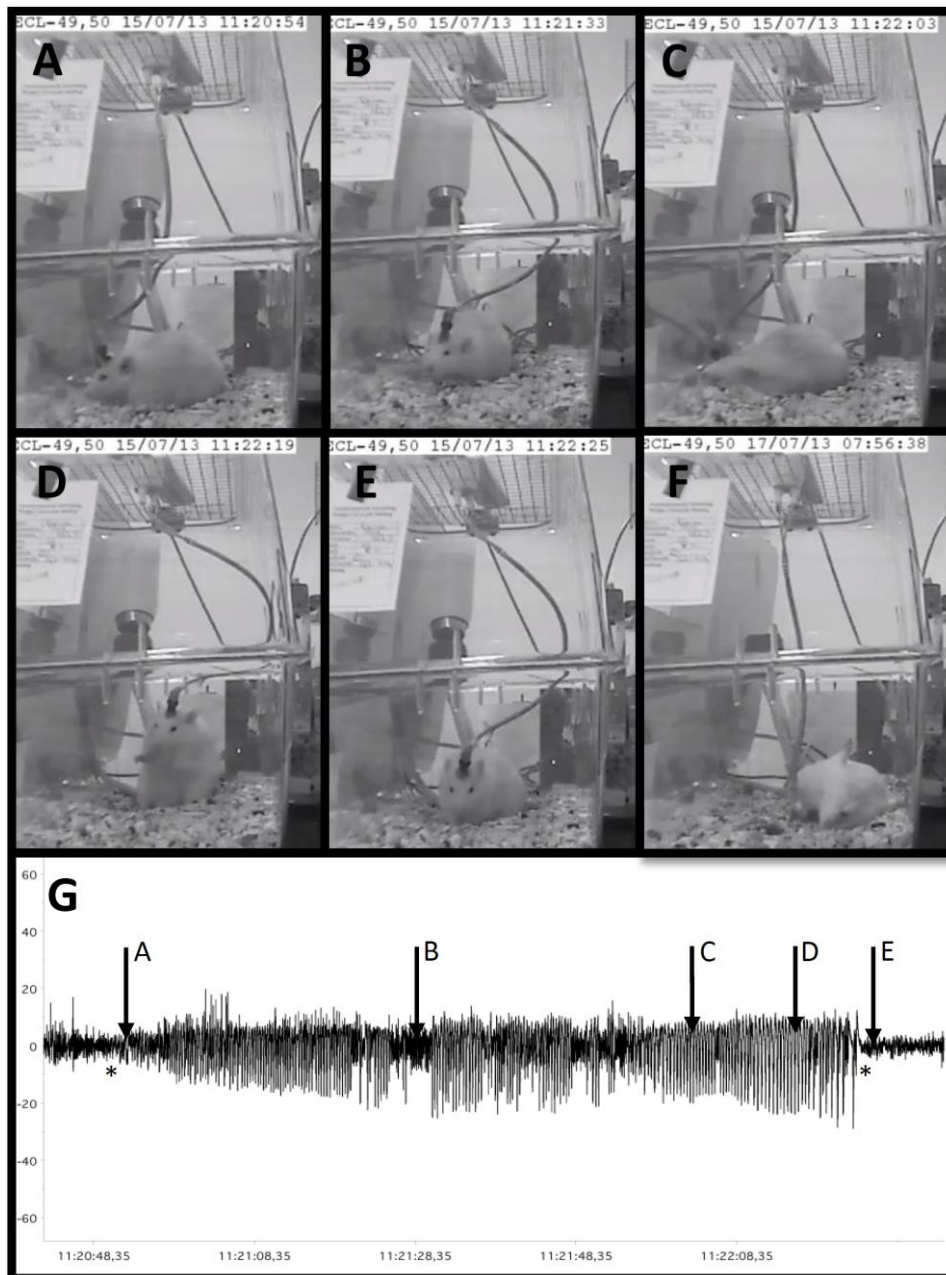


Abbildung 32: Video- und EEG-Daten eines epileptischen Anfalls

Darstellung der klinischen Stadien der Anfallsseminologie, dargestellt mittels Bildausschnitten aus dem Videomaterial. Die Bilder A-E sind Bildausschnitte aus dem Video des ersten epileptischen Anfalls (Anfallslänge 96s; Anfall der Klasse IV auf der Racine-Skala) von Ratte Nr. 36 (Kontrolle). Im Bild G ist die während dieses Anfalls abgeleitete Körnerzellaktivität dargestellt. Das Bild F ist ein Bildausschnitt aus dem Video des zweiten Anfalls (Anfallslänge 113s; Anfall der Klasse V auf der Racine-Skala) von Ratte Nr. 36. **A:** Anfallsbeginn in der Körnerzelleitung, klinisch ist die Ratte unauffällig und erkundet ihre Umgebung. **B:** 39s nach Anfallsbeginn im EEG kommt es zu den ersten erfassbaren Anfallssymptomen. Das Versuchstier beginnt mit repetitiven Bewegungen des Kopfes. (Racine Klasse I/II) **C:** 75s nach Anfallsbeginn im EEG kommt es zu Kloni beider Vorderpfoten. (Racine Klasse III) **D:** 90s nach Anfallsbeginn im EEG stellt sich die Ratte auf die Hinterbeine. Es entsteht eine tonische Beugung des Rückens. Die Kloni der Vorderpfoten bestehen weiterhin. (Racine Klasse IV) **E:** 100s nach elektrophysiologischem Anfallsbeginn sistiert die Anfallssymptomatik abrupt. Die klinischen Anfallssymptome bestanden vier Sekunden länger als die Anfallsaktivität im EEG. **F:** Anfall Zwei von Ratte 36. Hier kommt es 82s nach Anfallsbeginn im EEG zu einer tonischen Überstreckung des Rückens, was den Sturz des Tieres zur Folge hat. (Racine Klasse V) **G:** Körnerzelleitung während des ersten Anfalls von Ratte Nr. 36. Die Pfeile kennzeichnen die Stellen, an denen die Bilder A-E aufgenommen wurden. Die Sternchen (*) kennzeichnen den Beginn und das Ende des epileptischen Anfalls. [Eigene Abbildung]

7.3.6 Anfallsfrequenz

Da der Beobachtungszeitraum für eine statistisch valide Analyse der Anfallsfrequenz zu kurz war, erfolgte eine rein deskriptive Darstellung der Anfallsfrequenzen. Hierzu wurden Tiere einbezogen, bei denen im Beobachtungszeitraum mindestens ein Anfall aufgezeichnet wurde. Die durchschnittliche Anfallsfrequenz aller Tiere mit aufgezeichnetem Anfall (n=9) betrug 0.44 ± 0.22 Anfälle pro Tag (A/d). Die durchschnittliche Anfallsfrequenz der TPD-Gruppe (n=4) betrug 0.39 ± 0.24 A/d, die der Kontrollgruppe (n=5) 0.49 ± 0.18 A/d (

Tabelle 9).

Tabelle 9: Anfallsfrequenz

Ratte	Gruppe	Anfallsfrequenz (Anfälle / Tag)
3	TPD	0.25
11	TPD	0.33
12	TPD	0.17
15	TPD	0.8
36	Kontr.	0.5
44	Kontr.	0.5
47	Kontr.	0.8
52	Kontr.	0.25
53	Kontr.	0.4

7.4 Histologische Auswertung

Die Gehirne von 23 Versuchstieren wurden histologisch aufgearbeitet (TPD-Gruppe n=15; Kontrollgruppe n=8). Die Hippocampusflächen wurde nur bei 21 der 23 Versuchstiere ermittelt (TPD-Gruppe n=13; Kontrollgruppe N=8), da 2 Tiere der TPD-Gruppe wegen unvollständiger TPD von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden (Abbildung 33).

Bei der histologischen Analyse fiel auf, dass ein Teil der Tiere beider Gruppen trotz vollständig durchgeführter TPS (30'; 30'; 8h) keine klassische HS entwickelte. Die Ergebnisse der vorherigen Arbeiten mit dem NKTPS-Tiermodell, bei denen jedes vollständig stimulierte Tier spätestens 70 Tage nach Abschluss der TPS eine klassische HS (ILAE Typ I) entwickelte (Norwood et al. 2010; Will et al. 2013), konnten somit nicht reproduziert werden.

Um zu erfassen ob sich die TPD auf die Versuchstiere mit HS anders ausgewirkt hat als auf die Versuchstiere ohne HS, wurden alle histologisch analysierten Versuchstiere in zwei weitere Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe bestand aus Tieren mit klassischer HS (n=8), die andere aus den Tieren ohne HS (n=13; Abbildung 33). Zur Erfassung der Auswirkungen der TPD auf den im NKTPS-Tiermodell typischen Neuronenverlust wurden die Neuronen des Hilus und des CA von 6 Tieren (TPD-Gruppe n=3; Kontrollgruppe n=3) mit klassischer HS und von 2 Tieren der Kontrollgruppe ohne HS gezählt (Abbildung 33).

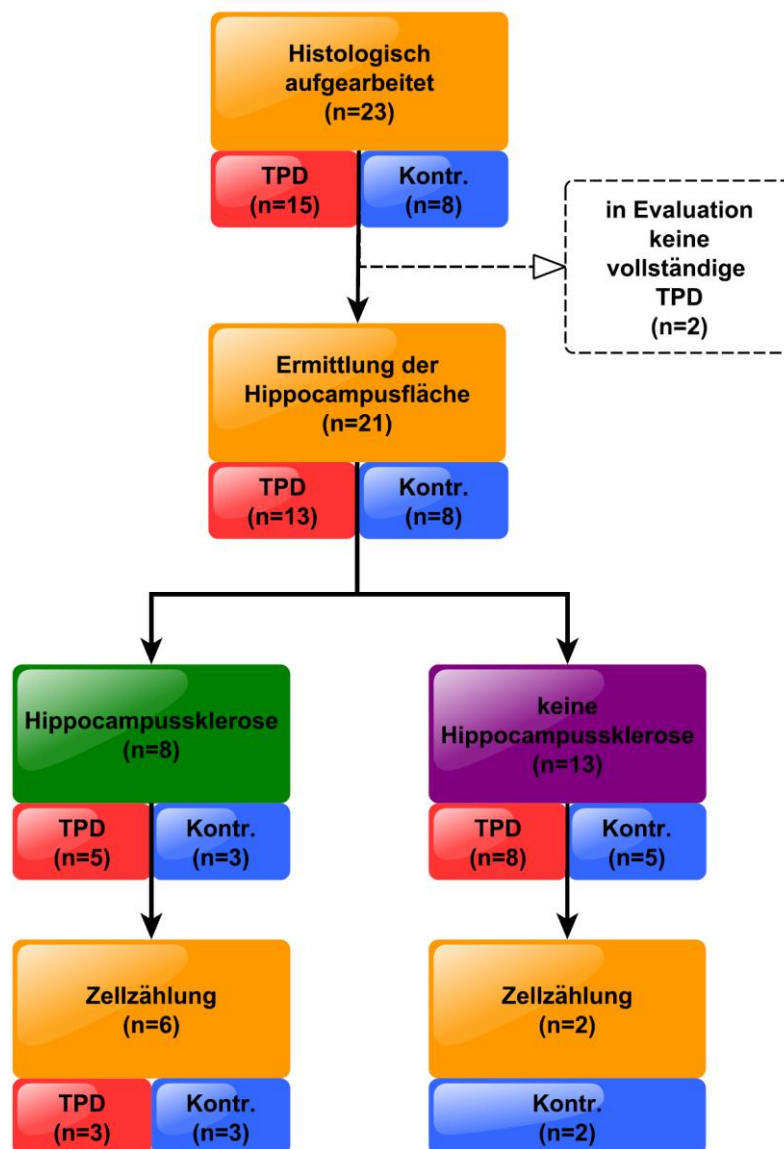


Abbildung 33: Ablauf der histologischen Auswertung

Darstellung des Ablaufs der histologischen Auswertung. Angabe der Anzahl der untersuchten Tiere und deren Gruppenzugehörigkeit. Nach der Ermittlung der Hippocampusfläche erfolgte die Einteilung der Tiere in eine Gruppe von Tieren mit klassischer HS und eine zweite Gruppe von Tieren ohne HS. [Eigene Abbildung]

7.4.1 Bestimmung der Hippocampusfläche

Die ermittelte durchschnittliche Hippocampusfläche pro Schnitt betrug $3.20 \pm 1.09 \text{ mm}^2$ in der TPD- und $3.59 \pm 1.39 \text{ mm}^2$ in der Kontrollgruppe. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p > 0.05$; Abbildung 34; Tabelle 10).

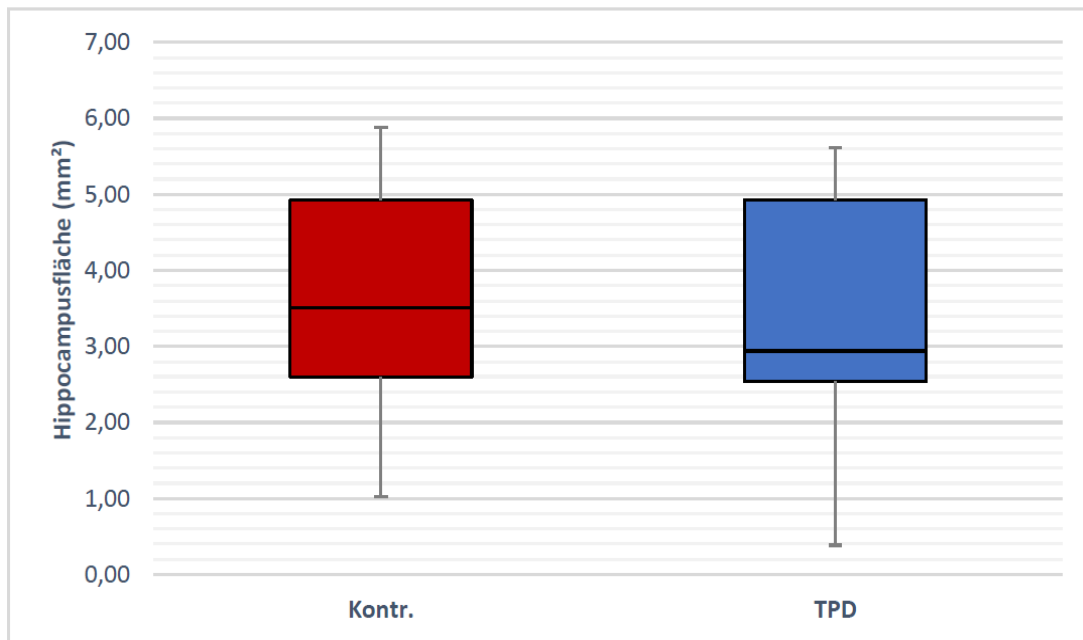


Abbildung 34: Hippocampusfläche in mm^2

Graphische Darstellung der Hippocampusfläche in mm^2 . Auf der Y-Achse wird die Hippocampusfläche in mm^2 angegeben, auf der X-Achse die Gruppenzugehörigkeit. Die Boxplots entsprechen dem Interquartilenabstand. Der Median wird als Strich angegeben. Die Antennen geben die minimal / maximal gemessene Hippocampusfläche an. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p > 0.05$). [Eigene Abbildung]

Tabelle 10: Durchschnittliche Fläche des Hippocampus

Ratte Nr.	Gruppe	Hippocampusklerose	durchschnittliche Fläche (mm²)
1	TPD	nein	4,14
3	TPD	ja	2,26
5	TPD	nein	4,31
10	TPD	ja	2,44
12	TPD	nein	5,04
13	TPD	nein	2,76
15	TPD	ja	1,46
16	TPD	ja	2,85
18	TPD	nein	3,88
19	TPD	nein	3,57
21	TPD	nein	4,14
24	TPD	nein	3,07
27	TPD	ja	2,5
25	Kontr.	nein	3,58
28	Kontr.	ja	2,26
29	Kontr.	nein	3,64
30	Kontr.	ja	2,08
31	Kontr.	nein	5,19
34	Kontr.	nein	5,02
36	Kontr.	ja	2,56
37	Kontr.	nein	4,41

Die durchschnittliche Hippocampusfläche eines Tieres entspricht dem Mittelwert aller für dieses Tier ermittelten Hippocampusflächen. Zusätzlich wird angegeben ob der histologische Befund einer klassischen HS entspricht. Zwei Tiere (Nr.13, 24) ohne HS weisen eine durchschnittliche Fläche des Hippocampus unter 3.5mm² auf. Bei diesen beiden Tieren bestand eine mäßig ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus ohne ersichtlichen Neuronenverlust in CA1 und CA3.

Während der Bestimmung der Hippocampusfläche fiel auf, dass einige der Versuchstiere, unabhängig von einer zuvor erfolgten TPD, keine histologischen Merkmale einer klassischen HS aufwiesen. Es erfolgte die Aufteilung aller histologisch analysierten Versuchstiere in eine Gruppe von Tieren mit und in eine Gruppe von Tieren ohne klassische HS. Eine klassische HS entsprach dabei der HS vom Typ I (Blumcke et al. 2007; Blumcke et al. 2013), bei der es zu einer Schrumpfung des Hippocampus mit ausgeprägtem Verlust der Pyramidenzellen in CA1 und CA3 kommt. Die Aufteilung der Tiere erfolgte anhand der Morphologie des Hippocampus in mit Nissel gefärbten Übersichtsaufnahmen (1.6-fache Vergrößerung). Um die histologische Diagnose einer HS zu stellen, musste in den histologischen Schnitten eine deutliche Schrumpfung des Hippocampus mit ausgeprägtem Zellverlust in CA1 und CA3 vorliegen (Abbildung 35).

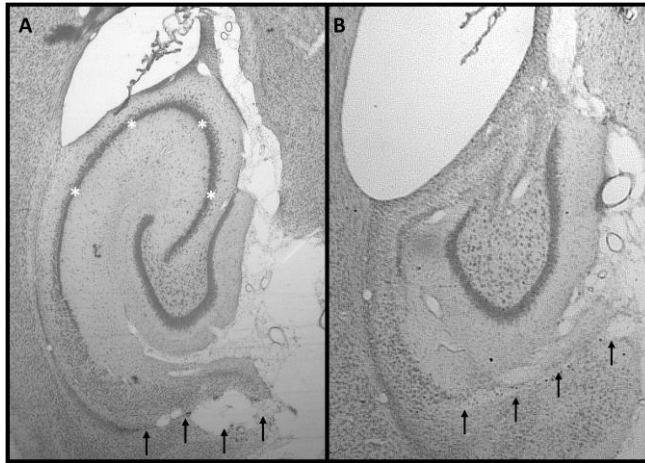


Abbildung 35: Versuchstier mit ausgeprägter HS und Versuchstier ohne HS

In 1.6-facher Vergrößerung abfotografierte Darstellung zweier mit Nissel gefärbter Hippocampi. Hier soll der Unterschied zwischen einem Tier mit (B) und einem Tier ohne klassischer HS (A) dargestellt werden. Beide Versuchstiere haben 3 TPS (30'/30'/8h) erhalten. A: Abbildung des linken Hippocampus von Versuchstier Nr. 12 (TPD-Gruppe). Der Verlauf der TPD wird durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet. Der Hippocampus ist kaum geschrumpft und die Pyramidenzellen von CA1 und CA3 (**weiße Sternchen**) stellen sich als dichtes, durch die Nisselfärbung schwarz angefärbtes Band dar. Dieses Tier wurde der Gruppe von Tieren ohne Ausbildung einer klassischen HS zugeordnet. B: Abbildung des linken Hippocampus von Versuchstier Nr. 27 (TPD-Gruppe). Der Verlauf der TPD wird durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet. Eine ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus ist ersichtlich. Ein zellreiches Band von Pyramidenzellen in CA1 und CA3 ist nicht mehr vorhanden. Das CA des Hippocampus erscheint insgesamt deutlich atrophisch, sodass der Hippocampus hauptsächlich vom GD und dem Subiculum gebildet wird. Dieses Tier wurde der Gruppe von Tieren mit Ausbildung einer klassischen HS zugeordnet. [Eigene Abbildung]

ramidenzellen von CA1 und CA3 (**weiße Sternchen**) stellen sich als dichtes, durch die Nisselfärbung schwarz angefärbtes Band dar. Dieses Tier wurde der Gruppe von Tieren ohne Ausbildung einer klassischen HS zugeordnet. B: Abbildung des linken Hippocampus von Versuchstier Nr. 27 (TPD-Gruppe). Der Verlauf der TPD wird durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet. Eine ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus ist ersichtlich. Ein zellreiches Band von Pyramidenzellen in CA1 und CA3 ist nicht mehr vorhanden. Das CA des Hippocampus erscheint insgesamt deutlich atrophisch, sodass der Hippocampus hauptsächlich vom GD und dem Subiculum gebildet wird. Dieses Tier wurde der Gruppe von Tieren mit Ausbildung einer klassischen HS zugeordnet. [Eigene Abbildung]

Bei 38% aller Versuchstiere (n=8) konnte die histologische Diagnose einer klassischen HS gestellt werden. In der TPD-Gruppe hatten 38.5% (n=5) der Versuchstiere eine klassische HS, in der Kontrollgruppe 37.5% (n=3). Von den 8 Tieren der TPD-Gruppe, die keine klassische HS entwickelten, wiesen 2 Tiere eine mäßig ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus ohne offensichtlichen Zellverlust in CA1 und CA3 auf (Ratte Nr. 13+24, Tabelle 10). Die Perfusionsfixierung erfolgte bei allen Tieren nach durchschnittlich 79 Tagen. Epileptische Anfälle wurden sowohl bei Tieren mit, als auch bei Tieren ohne histologische Diagnose einer HS beobachtet, wobei die Mehrzahl der epileptischen Anfälle bei Tieren mit HS beobachtet wurden. Die durchschnittliche Hippocampusfläche von Tieren mit histologisch diagnostizierter HS (n=8) betrug $2.30 \pm 0.73 \text{ mm}^2$, die der Tiere ohne HS (n=13) $4.06 \pm 0.99 \text{ mm}^2$. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0.05$; Abbildung 36). In der Subgruppe von Tieren mit histologisch diagnostizierter HS hatten die Tiere der TPD-Gruppe (n=5) eine durchschnittliche Hippocampusfläche von $2.30 \pm 0.70 \text{ mm}^2$, die der Kontrollgruppe (n=3) von $2.30 \pm 0.77 \text{ mm}^2$. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0.05$).

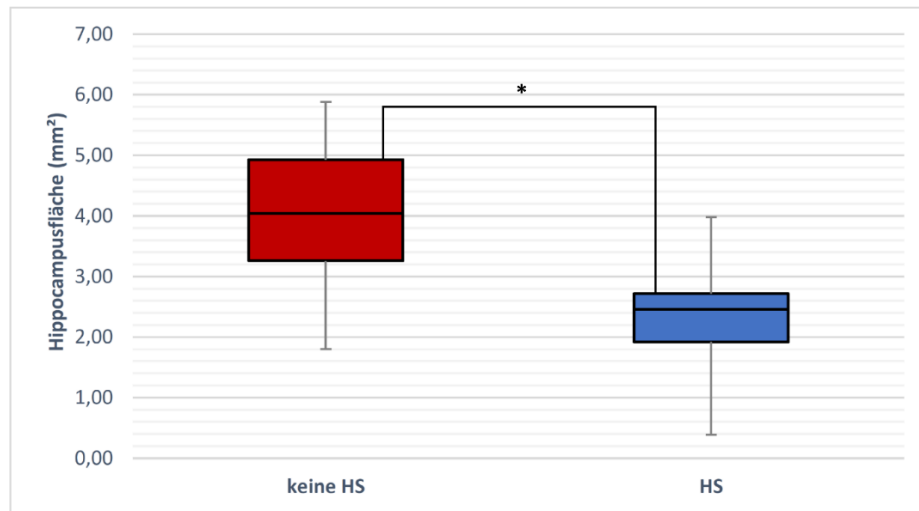


Abbildung 36: Hippocampusfläche von Tieren mit/ohne HS

Graphische Darstellung der Hippocampusfläche, von Tieren mit klassischer HS (**blaue Box**) und von Tieren ohne klassischer HS (**keine HS; rote Box**). Die Y-Achse gibt die Hippocampusfläche in mm² an, die X-Achse die Gruppenzugehörigkeit. Die Boxplots entsprechen dem Interquartilenabstand. Der Median wird als Strich angegeben. Die Antennen geben die minimal / maximal gemessene Hippocampusfläche an. Die Hippocampusfläche war bei den Tieren mit klassischer HS (n=8) statistisch signifikant kleiner als bei Tieren ohne HS (n=13) ($p < 0,05$). Der signifikante Unterschied ist mit einem **Sternchen** (*) gekennzeichnet. [Eigene Abbildung]

7.4.2 Neuronenzählungen

Der Hilus enthielt bei Tieren der TPD-Gruppe mit HS (n=3) durchschnittlich 307 ± 94 Neuronen/mm² (N/mm²) und bei Tieren der Kontrollgruppe mit HS (n=3) durchschnittlich 452 ± 233 N/mm². Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Das CA beinhaltete bei Tieren der TPD-Gruppe mit HS (n=3) durchschnittlich 164 ± 58 N/mm², bei Tieren der Kontrollgruppe mit HS (n=3) 188 ± 83 N/mm². Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Tabelle 11, Abbildung 37).

Tabelle 11: Durchschnittliche Neuronenzahl

Ratte Nr.	Gruppe	Hippocampusklerose	Neuronenzahl Hilus (N/mm ²)	Neuronenzahl CA (N/mm ²)
10	TPD	ja	296	130
16	TPD	ja	351	210
27	TPD	ja	273	151
28	Kontr.	ja	479	153
30	Kontr.	ja	331	203
36	Kontr.	ja	546	207
31	Kontr.	nein	350	285
37	Kontr.	nein	515	297

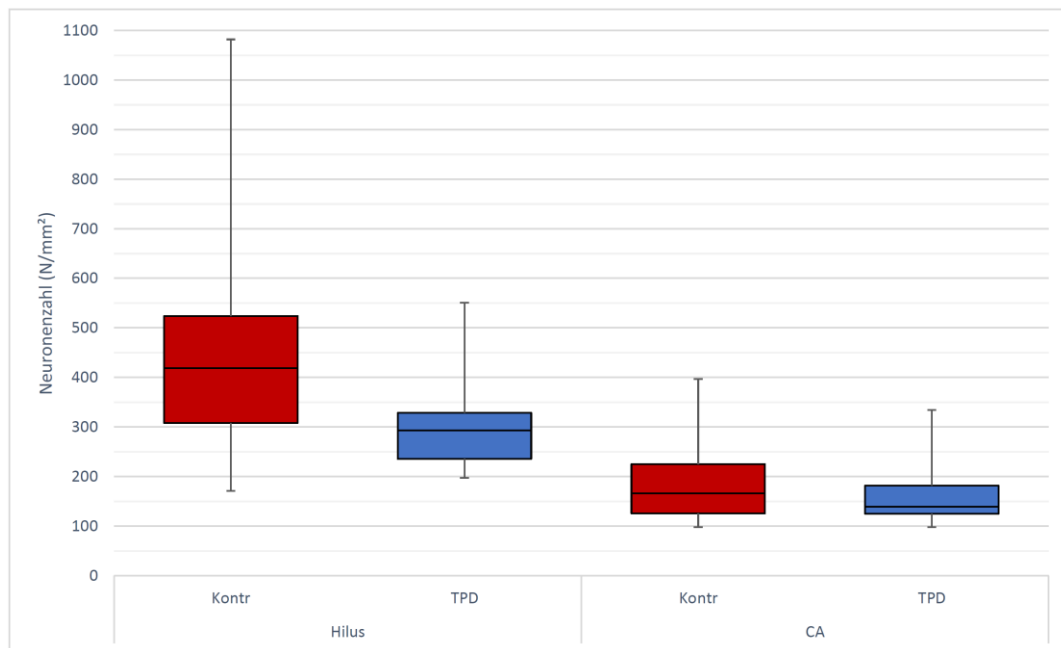


Abbildung 37: Neuronenzahl

Graphische Darstellung der Neuronenzahl des Hilus sowie des CA von Tieren nach TPD (TPD; blaue Box; $n=3$) und von Tieren der Kontrollgruppe (Kontr.; rote Box; $n=3$). Die Tiere beider Gruppen wiesen auf mit Nissel gefärbten Übersichtsaufnahmen (1.6-fache Vergrößerung) eine ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus auf. Die Y-Achse gibt die Neuronenzahl in Neuronen / mm^2 (N/mm^2) an, auf der X-Achse wird die Gruppenzugehörigkeit sowie das untersuchte Teilgebiet des Hippocampus angegeben. Die Boxplots entsprechen dem Interquartilenabstand. Der Median wird als Strich angegeben. Die Antennen geben die minimal / maximal gemessene Neuronenzahl an. Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p>0.05$) zwischen den beiden Gruppen. [Eigene Abbildung]

Die Neuronenzahl des Hilus war bei Tieren mit TPD und HS ($n=3$) um durchschnittlich $29\pm 22\%$ kleiner als bei Tieren ohne HS ($n=2$). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0.05$). Bei Tieren der Kontrollgruppe mit HS ($n=3$) war die Neuronenzahl des Hilus um durchschnittlich $4\pm 54\%$ höher als bei Tieren ohne HS ($n=2$). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p>0.05$). Das CA beinhaltete bei Tieren mit TPD und HS ($n=3$) um durchschnittlich $44\pm 20\%$ weniger Neuronen als bei Tieren ohne HS ($n=2$). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0.05$). Die Neuronenzahl des CA war bei Tieren der Kontrollgruppe mit HS ($n=3$) im Vergleich zu Tieren ohne HS ($n=2$) um durchschnittlich $36\pm 28\%$ reduziert. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0.05$; Tabelle 12; Abbildung 38).

Tabelle 12: Durchschnittliche und relative Neuronenzahl

	Hilus		Cornu Ammonis	
	Neuronen / mm ²	% von Tieren ohne HS	Neuronen / mm ²	% von Tieren ohne HS
TPD + HS (n=3)	307 ± 94	71 ± 22*	164 ± 58	56 ± 20*
Kontr. + HS (n=3)	452 ± 233	104 ± 54	188 ± 83	64 ± 28*

Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Neuronenzahl des Hilus und des CA von Tieren der TPD-Gruppe mit HS (TPD + HS, n=3) und von Tiere der Kontrollgruppe mit HS (Kontr. + HS, n=3). Die Neuronenzahl wird in Neuronen / mm² angegeben. Zusätzlich wird die auf die mittlere Neuronenzahl von Tieren ohne HS (n=2) bezogene, relative Neuronenzahl in Prozent angegeben. Bei statistisch signifikantem ($p < 0.05$) Unterschied der Neuronenzahl zwischen den Tieren mit und ohne HS wird dies mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Das CA beinhaltet bei allen Tieren mit HS signifikant weniger Neuronen als bei den Tieren ohne HS ($p < 0.05$). Die Neuronenzahl des Hilus war nur bei den Tieren der TPD-Gruppe mit HS signifikant geringer als bei den Tieren ohne HS ($p < 0.05$). Alle Werte werden als Median ± einer Standardabweichung angegeben.

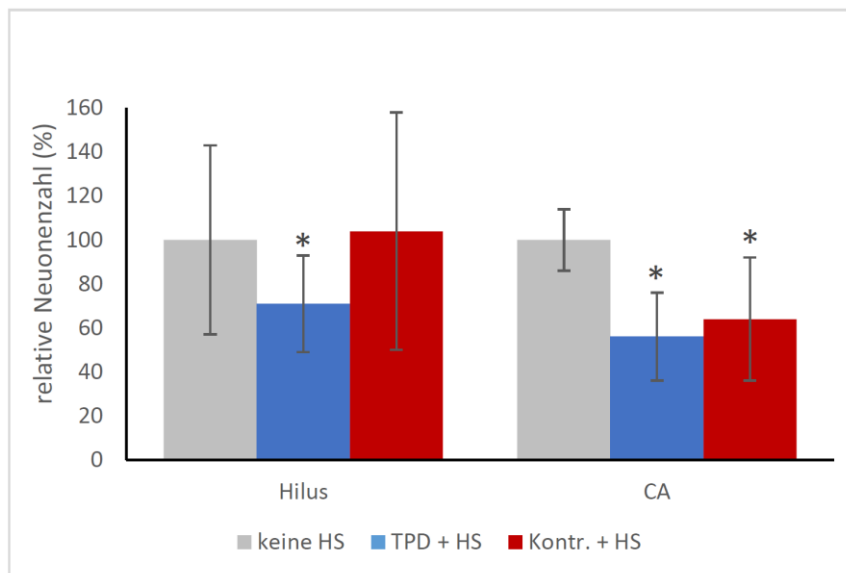


Abbildung 38: Relative Neuronenzahl

Graphische Darstellung der relativen Neuronenzahl des Hilus und des CA von Tieren der TPD-Gruppe (TPD+HS, blau, n=3) und der Kontrollgruppe (Kontr. + HS, rot, n=3) mit HS, bezogen auf die durchschnittliche Neuronenzahl von Tieren der Kontrollgruppe ohne HS (keine HS, grau, n=2). Auf der Y-Achse wird die relative Neuronenzahl als prozentualer Anteil angegeben (100% entspricht der bei Tiere ohne HS ermittelten durchschnittlichen Neuronenzahl), auf der X-Achse das analysierte Teilgebiet des Hippocampus. Statistisch signifikante Unterschiede der Neuronenzahl zwischen Tieren mit und ohne HS sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Das CA beinhaltet bei allen Tieren mit HS signifikant weniger Neuronen als bei Tieren ohne HS ($p < 0.05$). Die Neuronenzahl des Hilus war nur bei den Tieren der TPD-Gruppe mit HS signifikant verringert ($p < 0.05$). Die Säulendiagramme geben den Mittelwert an, die Antennen die Standardabweichung. [Eigene Abbildung]

8 Diskussion

8.1 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Eine Durchtrennung des Tractus perforans unmittelbar nach der Epilepsie induzierenden Läsion hatte im nicht-convulsiven-Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell weder messbare Auswirkungen auf die Epileptogenese, noch auf die Entwicklung einer klassischen Hippocampussklerose.

Die Durchtrennung des Tractus perforans hatte keine messbaren Auswirkungen auf das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle. Zwischen den Tieren der Gruppe mit Tractus perforans-Durchtrennungen und den Tieren der Kontrollgruppe bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Anfallslänge, der klinischen Anfallschwere und der Latenzzeit.

Die Durchtrennung des Tractus perforans hatte keine messbaren Auswirkungen auf die im nicht-convulsiven-Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell entstehenden chronischen histologischen Veränderungen des Hippocampus. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der ermittelten Fläche des Hippocampus bei der Gruppe mit Tractus perforans Durchtrennung und der Kontrollgruppe. Gleiches gilt für die ermittelte Anzahl von Neuronen im Hilus und im Cornu ammonis. Auch hier besteht zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Der für das nicht-convulsiven-Tractus-perforans-Stimulations -Tiermodell typische Neuronenverlust im Cornu ammonis war in beiden Gruppen ähnlich ausgeprägt.

8.2 Kritik der verwendeten Methoden und Einordnung unerwarteter Ergebnisse

Um die Ergebnisse des Experimentes besser in einen wissenschaftlichen Kontext einordnen zu können und ihre Wertigkeit zu bestimmen, erfolgt nun eine kritische Betrachtung einiger im Versuch verwendeter Methoden. Einige der in vorherigen Experimenten mit dem NKTPS-Tiermodell erhobenen Daten konnten in diesem Versuch nicht reproduziert werden. Auf diese Ergebnisse soll im folgenden Teil der Diskussion gesondert eingegangen werden, um mögliche Ursachen für die Diskrepanz der erhobenen Daten zu diskutieren.

8.2.1 Tractus perforans Durchtrennung

Um den resultierenden Hirnschaden und die damit assoziierte Mortalität und Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer posttraumatischen Epilepsie zu minimalisieren, wurde eine partielle Durchtrennung der Verbindungen zwischen EC und Hippocampus durchgeführt. Die Durchtrennung wurde auf den medialen Anteil des TP beschränkt, einige kleinere Leitungsbahnen zwischen EC und Hippocampus wurden somit nicht erfasst (van Strien et al. 2009). Daher läßt sich trotz Durchtrennung der meisten Fasern des TP nicht ausschließen, dass sich im EC generierte epileptiforme Potentiale weiterhin über die nicht durchtrennten Faserbahnen zum Hippocampus ausbreiten und dort einen Kindling-Effekt bewirken.

Zusätzlich wird der GD bei Ratten 9-16 Tage nach ipsilateraler Deafferenzierung von den Axonen des kontralateralen EC reinnerviert (Steward et al. 1974). Würde durch die Reinnervation eine für die Epileptogenese essentielle Verbindung zwischen EC und GD wiederhergestellt, würde man eine Verlängerung der Latenzzeit um mindestens 9 Tage erwarten. Eine Verlängerung der Latenzzeit wurde in diesem Experiment nicht beobachtet (Tabelle 7; Abbildung 28), daher ist es unwahrscheinlich, dass durch die Reinnervation des GD eine für die Epileptogenese essentielle Verbindung wiederhergestellt wurde. Allerdings ist die Reinnervation des GD kurz vor dem Auftreten erster spontaner Anfälle abgeschlossen, sodass eine aberrante Reinnervation des GD ein möglicher proepileptogener Mechanismus sein könnte.

Insgesamt sind die Ergebnisse dieses Experimentes nicht als Beweis dafür anzusehen, dass die Epileptogenese im NKTPS-Tiermodell völlig unabhängig von einer anatomischen Verbindung zwischen Hippocampus und EC stattfinden kann. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind eher ein Hinweis darauf, dass die Intaktheit der Hauptverbindung zwischen MEC und Hippocampus keine essentielle Voraussetzung für die Entstehung einer Epilepsie im NKTPS Tiermodell ist.

Die Methode, neuronale Verbindungen durch mechanische Läsionen zu beeinflussen, weist zudem generell einige Nachteile auf. Mechanische Läsionen sind immer mit einem Neuronenschaden und der damit assoziierten Mortalität, Morbidität und dem Risiko der Entwicklung einer posttraumatischen Epilepsie assoziiert (Steward et al. 1974; McIntosh et al. 1989; Kelley und Steward 1996; Pitkanen et al. 2009; Kharaishvili und Pitkanen 2010). Als Alternative zu mechanischen Läsionen können neuronale Netzwerke auch mit nicht-traumatischen-Methoden beeinflusst werden. So

kann man Gruppen von Neuronen mit optogenetischen Methoden (Boyden et al. 2005; Deisseroth 2011; Krook-Magnuson et al. 2013; Zhao et al. 2015) temporär inaktivieren ohne einen neuronalen Schaden zu Verursachen. In zukünftigen Experimenten zur Untersuchung der Auswirkungen neuronaler Netzwerke auf die Epileptogenese sollten solche Methoden bevorzugt verwendet werden.

8.2.2 Versuche von anderen Arbeitsgruppen mit Tractus perforans Durchtrennungen in Epilepsiemodellen

In Experimenten anderer Arbeitsgruppen, welche diesem Experiment äquivalente stereotaktische Koordinaten und Methoden für die TPD verwendeten, hatten Durchtrennungen des TP Auswirkungen auf die Epileptogenese, den Kindling Prozess oder den in Post-SE Tiermodellen resultierenden Neuronenverlust:

- Bei genetisch veränderten Wüstenspringmäusen verhinderte eine beidseitige TPD das Auftreten epileptischer Anfälle, welche zuvor während des Umgebungswechsels auftraten (Ribak und Khan 1987).
- Eine vor Kainat-Injektionen in die Amygdala durchgeführte ipsilaterale TPD verhinderte einen Neuronenverlustes außerhalb des Injektionsortes (Ben-Ari et al. 1980b).
- Eine vor Kainat-Injektionen in den Hippocampus durchgeführte ipsilaterale TPD verhinderte einen Körnerzellverlust (Kohler et al. 1978).
- Eine beidseitige TPD führte zu einer signifikanten Verlangsamung eines anschließend durchgeführten Amygdala-Kindlings. Außerdem entstanden bei 60% der Tiere keine epileptischen Anfälle der Stufe IV und V nach Racine. Die Entstehung konvulsiver Anfälle war beim Amygdala-Kindling also abhängig von einer intakten Verbindung zwischen MEC und Hippocampus (Savage et al. 1985).

Die antiepileptogenen Eigenschaften, die eine äquivalent durchgeführte TPD in den o.g. Versuchen aufwies, konnten in diesem Experiment nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des im Kainat-Tiermodell beobachteten neuroprotektiven Effektes einer TPD wäre der variierende Zeitpunkt, an dem die TPD durchgeführt wurde. Bei den Experimenten im Kainat-Tiermodell wurde die TPD vor der Epilepsie induzierenden Läsion (EIL) durchgeführt (Kohler et al. 1978; Ben-Ari et al. 1980b) und konnte den akuten neurotoxischen Effekt der EIL (der Kainat-Injektion)

beeinflussen. In diesem Versuch erfolgte die TPD nach der EIL und hatte daher keine Auswirkungen auf einen schon während des SE entstandenen Neuronenverlust (Tabelle 11, Abbildung 37). Hierdurch lässt sich schlussfolgern, dass der neuroprotektive Effekt einer im Kainat-Tiermodell durchgeführten TPD (Kohler et al. 1978; Ben-Ari et al. 1980b) hauptsächlich von einer direkten Beeinflussung der EIL resultierte. Einen ähnlichen neuroprotektiven Effekt könnte man im NKTPS-Tiermodell nur durch eine Durchführung der TPD vor den TPS reproduzieren.

Insgesamt unterstützt das Ausbleiben neuroprotektiver Effekte einer nach der EIL durchgeführten TPD die Hypothese von Sloviter et al., dass der mit der TLE assoziierte Neuronenverlust durch die „initial precipitating injurie“ (IPI) verursacht wird und bereits unmittelbar nach der IPI in vollem Umfang besteht (Sloviter et al. 2012). Somit erscheint es naheliegend, dass man den mit einer TLE assoziierten Neuronenverlust nur durch eine Beeinflussung der IPI selbst reduzieren kann. Antiepileptogene Interventionen während der Latenzzeit könnten einen Effekt auf langsamer verlaufende histologische Veränderungen wie eine Moosfasersprossung aufweisen (Nadler et al. 1980; Dudek und Staley 2012; Heng et al. 2013; Radzik et al. 2015). Den initial entstehenden Neuronenverlust können sie aber nicht mehr beeinflussen.

Die TPD führte im Kindling-Tiermodell und bei den Wüstenspringmäusen vor allem zu einer Reduktion der klinischen Anfallsschwere (Savage et al. 1985; Ribak und Khan 1987). Daher vermuteten die Autoren dieser Studien, dass die TPD die Ausbreitung der epileptischen Anfälle über den Hippocampus auf den motorischen Kortex verhin-derte. Da die TPD in dieser Studie weder einen Effekt auf die klinische Anfallsschwere, noch auf die Anfallslänge aufwies (Tabelle 8, Abbildung 30), scheint der TP im NKTPS-Tiermodell keine für die Anfallsprogression essentielle Faserbahn zu sein.

8.2.3 EEG-Beobachtung

Insgesamt wurde der angestrebte Beobachtungszeitraum von 18 Tagen nur bei einem Tier (4%) eingehalten. Bei den restlichen Versuchstieren musste die EEG-Beobachtung nach durchschnittlich 5.5 Tagen abgebrochen werden, da die „Elektrodenkappe“ verloren ging (Abbildung 27). Insgesamt führte der häufige Verlust der „Elektrodenkappen“ zu einer reduzierten Validität der erhobenen elektrophysiologischen Daten. So bleibt es unklar ob sich bei den zwanzig Versuchstieren (68% aller beobachteten Versuchstiere), bei denen während der Beobachtungszeit keine epileptischen Anfälle aufgezeichnet wurden, zu einem späteren Zeitpunkt epileptische Anfälle entwickelt

hätten. Zusätzlich wurde die Beobachtung erst 14 Tage nach der EIL begonnen, sodass keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Tiere während der ersten 14 Tage nach TPS, entsprechend vorheriger Experimente mit dem NKTPS-Tiermodell (Norwood et al. 2010), anfallsfrei waren.

In Post-SE-Tiermodellen der TLE wurde vor dem Auftreten des ersten konvulsiven Anfalls stets ein nicht-konvulsiver epileptischer Anfall aufgezeichnet (Bumanglag und Sloviter 2008; Williams et al. 2009a; Löscher et al. 2015). Dies wurde als Hinweis für die Beteiligung eines Kindling-Prozesses an der Epileptogenese gewertet (Dudek und Staley 2012; Sloviter et al. 2012; Löscher et al. 2015). Dieses Phänomen konnte im NKTPS-Tiermodell nicht reproduziert werden. Der erste beobachtete epileptische Anfall führte sowohl in diesem Experiment (Tabelle 8), als auch in der Studie von Norwood et al. stets zu klinischen Symptomen der Versuchstiere (Norwood et al. 2010). Eine als Hinweis für die Beteiligung eines Kindling-Effektes an der Epileptogenese gewertete progrediente Zunahme der Anfallsschwere und Anfallslänge (Bertram und Cornett 1993; Bertram und Cornett 1994) wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Insgesamt wäre es bei zukünftigen Experimenten, in denen Versuchstiere über einen längeren Zeitraum EEG-Überwacht werden, erstrebenswert, ein kabelloses, in das Versuchstier implantierbares Überwachungssystem zu verwenden (z.B.: TR50BB Dual Biopotential Telemeter, Telemetry Research, Auckland, Neuseeland). Die Verwendung eines solchen Systems war in diesem Versuch nicht möglich, da es zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keinen Adapter für den Anschluss von Tiefenelektroden an das Telemeter gab. In einem Pilotprojekt, in dem ein eigens konstruierter Adapter verwendet wurde, kam es einige Stunden nach der Implantation des Systems zur Ausbildung eines Kurzschlusses, welcher zum Beobachtungsabbruch führte.

8.2.4 Revidierte Betrachtung der histologischen Veränderungen

Unabhängig von einer zuvor durchgeführten TPD und trotz vollständiger TPS entwickelte nur ein Teil der Versuchstiere die chronischen histologischen Veränderungen einer klassischen HS. Nur bei 38% aller histologisch analysierten Versuchstiere (8 von 21 Versuchstieren) wurde, unter Verwendung der Kriterien der ILAE (Blumcke et al. 2013), die Diagnose einer klassischen HS (ILAE Typ I) gestellt. Bei 10% der histologisch analysierten Versuchstiere (2 von 21 Versuchstieren) bestand eine mäßig ausgeprägte Schrumpfung des Hippocampus ohne offensichtlichen Zellverlust im CA. Die restlichen 52% der histologisch analysierten Versuchstiere (11 von 21 Versuchstieren)

entwickelten keine HS. Die Gruppe der Tiere ohne HS ließ sich insgesamt in zwei Subgruppen aufteilen: Versuchstiere die eine TLE ohne HS entwickelt haben und Versuchstiere, bei denen die TPS keine Epilepsie induzierte (Abbildung 39).

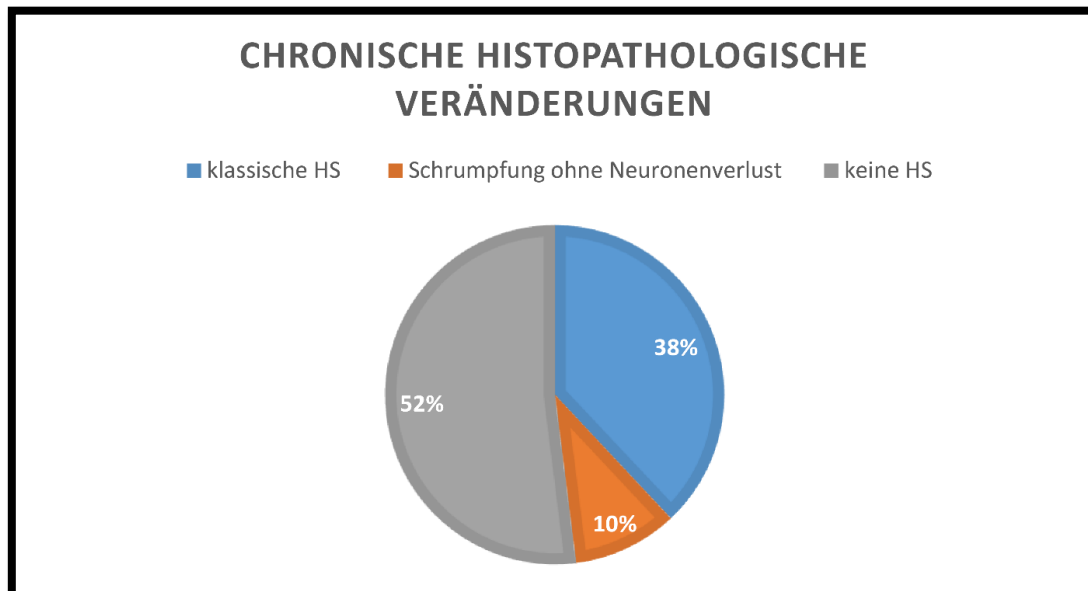


Abbildung 39: Chronische histologische Veränderungen im NKTPS-Tiermodell

Graphische Darstellung der chronischen histologischen Veränderungen, unabhängig von einer zuvor durchgeführten TPD. 38% der 21 histologisch analysierten Versuchstiere wiesen bei Verwendung der ILAE Kriterien (Blumcke et al. 2013) eine klassische HS (Typ I) auf. Bei 10% der Versuchstiere war der Hippocampus mäßig geschrumpft, es bestand aber kein offensichtlicher Neuronenverlust. Die restlichen 52% der Versuchstiere wies keine histologischen Veränderungen im Vergleich zu altersentsprechenden naiven Ratten auf (Paxinos und Watson 2007). Hierbei wurde bei einem Tier ohne HS ein Anfall aufgezeichnet, bei anderen Versuchstieren ohne HS wurde trotz einer Beobachtungszeit von über 10 Tagen kein epileptischer Anfall aufgezeichnet, sodass diese Tiere mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Epilepsie entwickelt haben. Die Tiere ohne chronische histologische Veränderungen lassen sich also in eine Gruppe von Tieren mit TLE ohne HS (Typ noHS) und in eine Gruppe von Tieren ohne Epilepsie einteilen. [Eigene Abbildung]

Die genaue Anzahl der Tiere ohne Epilepsie und der Tiere mit TLE ohne HS konnte wegen der hohen Variabilität der Beobachtungszeiten nicht ermittelt werden. Allerdings wurde bei 5 der 29 beobachteten Tiere (17%) während einer Beobachtungszeit von über 10 Tagen kein epileptischer Anfall aufgezeichnet. Bei diesen 5 Tieren kann mit relativ großer Sicherheit behauptet werden, dass sie keine Epilepsie entwickelt haben. Die 3 histologisch analysierten Tiere dieser Gruppe hatte keine typische HS.

In bisherigen Experimenten mit dem NKTPS-Tiermodell wiesen alle Versuchstiere spätestens 70 Tage nach der TPS die histologischen Veränderungen einer klassischen HS vom ILAE Typ I auf (Norwood et al. 2010; Will et al. 2013). Dies konnte in diesem

Experiment nicht reproduziert werden, obwohl die chronischen histologischen Veränderungen im NKTPS-Tiermodell erstmalig detailliert und in einer größeren Fallzahl (n=21) analysiert wurden. Die detaillierte Analyse ergab ein diverseres Muster der chronischen histologischen Veränderungen im NKTPS-Tiermodell als bisher angenommen. Es scheint entsprechend der menschlichen TLE (Blumcke et al. 2007; Blumcke et al. 2013) zur Ausbildung variabler Subtypen der HS zu kommen (Abbildung 39). Einige Tiere bilden im NKTPS-Tiermodell den ILAE Typ I, andere den ILAE Typ noHS aus. Ob die anderen bei TLE Patienten beobachteten Subtypen der HS (ILAE Typ II oder TypIII) ebenfalls im NKTPS-Tiermodell exprimiert werden, wurde in diesem Experiment nicht untersucht und könnte in zukünftigen detaillierteren Studien analysiert werden. Da die Subtypen der HS einerseits Auswirkungen auf die Prognose der TLE haben (Blumcke et al. 2007) und andererseits jeweils mit anderen Äthiologien assoziiert sind (van Paesschen et al. 1997; Blumcke et al. 2007; Blumcke et al. 2013), wäre ein Tiermodell, indem die verschiedenen Unterformen der HS exprimiert werden, von hohem wissenschaftlichem Interesse.

In diesem Experiment haben einige Versuchstiere, unabhängig von einer zuvor durchgeführten TPD, keine spontanen epileptischen Anfälle entwickelt. Dies widerspricht den Ergebnissen der Studie von Norwood et al. 2010, in der bei allen vollständig stimulierten Versuchstieren im NKTPS-Tiermodell spontane Anfälle beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung für die Verhinderung der Epilepsieentstehung bei einigen Versuchstieren wäre die bei allen Versuchstieren unmittelbar nach der EIL durchgeführte Analogsedierung mit 120mg/kgKG Ketamin. Ketamin ist ein in der klinischen Medizin verwendeter NMDA-Rezeptor-Antagonist, der antiepileptische Eigenschaften aufweist (Twele et al. 2015) und auch einen schweren SE terminieren kann (Vermoesen et al. 2010; Dorandeu et al. 2013). Im Post-SE-Tiermodell konnte nach dem SE appliziertes Ketamin den resultierenden Neuronenschaden reduzieren (Cunha et al. 2009), eine Ketamingabe während des SE verhinderte die spätere Entstehung spontaner epileptischer Anfälle und die damit assoziierten kognitiven Leistungseinbußen (Hort et al. 1999). Zusätzlich verlangsamt Ketamin im Kindling-Tiermodell den Kindling-Prozess (Trommer und Pasternak 1990). Insgesamt ist Ketamin eine Substanz mit potentiell antiepileptogenen Eigenschaften. Es ist daher möglich, dass die Epilepsieentstehung bei einigen Versuchstieren durch die einmalige Verabreichung von 120mg/KG Ketamin verhindert wurde. Da unser Studiendesign nicht für die Beantwortung der Fragestellung, ob Ketamin die Epileptogenese im NKTPS-Tiermodell

beeinflusst, angelegt war, ist die Durchführung weitere Experimente für die Überprüfung dieser Hypothese notwendig.

Ein alternativer Erklärungsansatz für das Ausbleiben spontaner epileptischer Anfälle bei einigen Versuchstieren wäre, dass es im NKTPS Tiermodell, entsprechend der Erfahrungen mit anderen Tiermodellen der TLE (Bumanglag und Sloviter 2008; Löscher und Brandt 2010), nicht bei allen Tieren zur Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle kommt. Andererseits könnte auch ein studieninterner Störfaktor für die in diesem Versuch relativ hohe Anzahl an Tieren, die trotz vollständiger TPS keine Epilepsie entwickelten (17% der Tiere hatten während einer Beobachtungszeit von >10d keine epileptischen Anfälle) verantwortlich sein. Die 8 Stunden lange TPS erfolgte teilweise bei zwei Tieren gleichzeitig. Bei solchen gleichzeitig stimulierten „Pärchen“ entwickelte oft nur eins der Tiere eine klassische HS und epileptische Anfälle. Diese Diskrepanz zwischen diesen gleichzeitig stimulierten Tieren könnte auch durch Materialfehler oder unerkannte Variationen der Stimulationsparameter entstanden sein. Hierbei müsste der Unterschied allerdings minimal sein, da die während der TPS aufgezeichnete Körnerzellaktivität nicht zwischen den einzelnen Versuchstieren variiert.

8.2.5 Neuronenzählung

Die Neuronenzählung erfolgte entsprechend vorheriger Studien (Kienzler et al. 2009; Norwood et al. 2010) mit einer „zweidimensionalen“ Zählmethode (Bartheld 2002). Aufgrund der höheren Fehleranfälligkeit „zweidimensionaler“ Zählmethoden (Bartheld 2002) erfolgt die Zellzählung in aktuellen Studien oft stereologisch mit „dreidimensionalen“ Zählmethoden, wie der „optical-fractionator-Methode“ (Gundersen et al. 1988; Bartheld 2002; Miller et al. 2014; Golub et al. 2015). Diese Methoden wurden in dieser Arbeit nicht angewandt, da die o.g. niedrigere Fehleranfälligkeit nur bei korrekter Durchführung besteht (Bartheld 2002) und diese Methoden schwierig zu erlernen, kosten- sowie zeitintensiv sind. Da die Neuronenzählungen somit nicht nach dem aktuellen „Goldstandard“ der Zellzählung erfolgten, sind die erfassten Werte nicht als absolute Neuronenzahlen, sondern eher als Annäherungen an den wahren Wert der Neuronenzahl aufzufassen.

Bei Tieren mit eindeutiger HS hatte eine TPD keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Neuronenzahl des Hilus und des CA (Abbildung 37; Tabelle

12). Alle Tiere mit eindeutiger HS hatten eine, im Vergleich zu Tieren ohne HS, signifikant reduzierte Neuronenzahl des CA (Tabelle 12). Allerdings bestand nur bei Tieren der TPD-Gruppe mit eindeutiger HS eine signifikante Reduktion der Neuronenzahl des Hilus um $29 \pm 22\%$ (Tabelle 12; Abbildung 38).

Bei einem Vergleich mit der im Hilus ermittelten Neuronenzahl von Tieren ohne HS, beinhaltete der Hilus von Tieren der TPD-Gruppe mit HS signifikant weniger Neuronen, der Hilus von Tieren der Kontrollgruppe mit HS zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 12; Abbildung 38). In vorherigen Experimenten mit dem NKTPS Tiermodell bestand bei allen vollständig stimulierten Tieren eine Reduktion der Neuronenzahl des Hilus um $75 \pm 10\%$ (Norwood et al. 2010). Dieses Ergebnis konnte in diesem Experiment nicht reproduziert werden. Allerdings wurden die ermittelten Neuronenzahlen in vorherigen Experimenten mit denjenigen naiver Kontrollen verglichen (Norwood et al. 2010). In diesem Experiment wurden die ermittelten Neuronenzahlen mit den Neuronenzahlen von Tieren verglichen, die keine eindeutige HS aufwiesen, aber gleichwohl eine vollständige TPS erhielten. Es ist daher möglich, dass im Vergleich zu naiven Tieren in allen drei Gruppen (HS+TPD; HS+Kontr; keine HS) eine signifikante Reduktion der Neuronenzahl des Hilus vorlag, welche zwischen den Gruppen in ihrer Ausprägung variierte.

Weiterhin könnte der in diesem Experiment bei den Tieren der Kontrollgruppe ausbleibende hiläre Neuronenverlust durch einen neuroprotektiven / antiepileptogenen Effekt des unmittelbar nach der letzten TPS applizierten Ketamins bedingt sein (Cunha et al. 2009). Dieser neuroprotektive Effekt scheint durch eine TPD reduziert zu werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine TPD selbst zu einem Neuronenverlust führen kann. Die Läsion des TP ist mit einem Neuronenverlust in der Lamina II des EC assoziiert (Peterson et al. 1994), eine Läsion des EC führt zu einem akuten Körnerzellverlust im GD (Kovac et al. 2004) und zu einem chronischen Neuronenverlust in CA3 (Poduri et al. 1995). Ein Einfluss einer TPD auf die Neuronendichte des Hilus wurde bisher nicht festgestellt, aber in den oben zitierten Studien auch nicht separat analysiert.

Zusammengefasst hatte eine TPD keinen messbaren Einfluss auf die Neuronenzahl des Hilus und des CA. Ob ein neuroprotektiver Effekt den Neuronenverlust im Hilus bei Tieren der Kontrollgruppe verhinderte, bleibt unklar, da der Vergleich mit einer naiven Kontrollgruppe fehlt.

8.3 Überprüfung der Hypothesen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des durchgeführten Experimentes erfolgt nun die Überprüfung der zwei vor Versuchsbeginn aufgestellten Hypothesen.

8.3.1 Hypothese II

Die Hauptaussage von Hypothese II konnte durch die Ergebnisse dieses Experimentes widerlegt werden:

Die „Ausreifung“ der Epilepsie erfolgte in diesem Versuch unabhängig von einer intakten Verbindung zwischen MEC und Hippocampus. Die TPD hatte keine messbaren Auswirkungen auf die Epileptogenese. Zudem führte die Durchtrennung der Hauptverbindung zwischen MEC und Hippocampus nicht zu einem Sistieren des Auftretens spontaner Körnerzellpotentiale.

Obwohl die Körnerzellen nach der Durchtrennung des TP keine Afferenzen aus dem MEC erhielten, wurden weiterhin spontane Körnerzellpotentiale und epileptische Anfälle beobachtet. Somit trifft die Annahme, dass die spontanen Körnerzellpotentiale und epileptischen Anfälle im NKTPS-Modell der TLE durch aberrante Efferenzen aus dem MEC evoziert bzw. generiert werden, nicht zu. Die spontanen Körnerzellpotentiale entstehen entweder durch eine spontane epileptiforme Aktivität der Körnerzellen selbst oder werden durch aberrante Efferenzen aus den anderen Teilgebieten des Hippocampus evoziert. Da der GD elektrophysiologische Eigenschaften aufweist, die das Entstehen spontaner epileptiformer Potentiale unterdrücken (Bear und Lothman 1993) und die elektrophysiologische „Torwächterfunktion“ des GD während der Epileptogenese sogar zunimmt (Goldberg und Coulter 2013), ist ein Entstehen der spontanen epileptiformen Potentiale innerhalb des GD eher unwahrscheinlich. Daher ist es naheliegend, dass die spontanen Körnerzellpotentiale durch aberrante Efferenzen aus dem restlichen Hippocampus evoziert werden. Die spontanen Potentiale könnten im CA, im Subiculum oder im parahippocampalen Kortex generiert werden und sich reziprok (Andersen et al. 1971; van Strien et al. 2009) auf die Körnerzellen ausbreiten. Die Ausbreitung epileptischer Anfälle könnte dabei über dieselben Wege erfolgen.

8.3.2 Der Ursprungsort epileptiformer Potentiale und epileptischer Anfälle

Die Bestimmung des Ursprungs epileptiformer Potentiale und epileptischer Anfälle erfolgte in der Arbeitsgruppe von Sloviter et al. ausschließlich mit in der Körnerzellschicht liegenden Tiefenelektroden (Bumanglag und Sloviter 2008; Bower und Buckmaster 2008; Norwood et al. 2010; Sloviter et al. 2012). Hierbei wurden der GD und der MEC als Entstehungsorte der spontanen epileptiformen Aktivität bestimmt, da die während eines Anfalls beobachteten Körnerzellpotentiale vor den ersten klinischen Zeichen auftraten (Sloviter et al. 2007, S. 7). Die Arbeitsgruppe von P. S. Buckmaster konnte die räumlichen und zeitlichen Eigenschaften von prä- und interiktal auftretenden Potentialen im Pilocarpin Tiermodell mit deutlich valideren Methoden analysieren (Toyoda et al. 2013; Fujita et al. 2014; Toyoda et al. 2015). In einem Experiment wurden Tiefenelektroden in bis zu 32 verschiedene Gehirnregionen implantiert und der Ort der frühesten Anfallsaktivität rechnerisch ermittelt (Toyoda et al. 2013). Der Ort der frühesten Anfallsaktivität variierte in diesem Experiment inter- und intraindividuell stark und wurde am häufigsten im Subiculum und im ventralen Hippocampus lokalisiert (Toyoda et al. 2013). Ein eindeutiger Ort des Anfallsursprungs konnte also nicht definiert werden (Toyoda et al. 2013), die epileptischen Anfälle hatten einen multifokalen Ursprung. Andere Experimente ergaben, dass es bereits Minuten vor der Anfallsentstehung zu Veränderungen des Feuermusters einzelner Neuronenpopulationen in unterschiedlichen Teilgebiete des Hippocampus kommt (Fujita et al. 2014; Toyoda et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Experimente passen zu funktionellen Untersuchungen von Patienten mit sogenannten fokalen Epilepsien, bei denen globale Veränderungen auf Netzwerkebene bestanden (Haneef et al. 2014; Bernhardt et al. 2015; Jin et al. 2015). Somit wandelt sich das Verständnis von der TLE als fokale Erkrankung des Temporallappens hin zu einem Verständnis der TLE als globaler Erkrankung großer Netzwerke des ZNS (Fujita et al. 2014; Bernhardt et al. 2015). Die fehlende Beeinflussung der Epileptogenese durch die Durchtrennung einer der wichtigsten Faserbahnen innerhalb des Temporallappens ist kohärent mit dem Verständnis der TLE als Netzwerkerkrankung. Basiert eine Erkrankung auf der pathologischen Veränderung eines großen, hochgradig verknüpften Netzwerkes, kann die Ausschaltung eines einzelnen Knotenpunktes (z.B. des TP) kompensiert werden und die Erkrankung unbeeinflusst fortbestehen (Bernhardt et al. 2015).

Der Ursprungsort epileptischer Anfälle wurde im NKTPS-Tiermodell bisher nicht ge-

nau bestimmt. Eine zumindest multifokale Entstehung der epileptischen Anfälle, sowie der spontanen Körnerzellpotentiale, ist nicht erweisen, erscheint aufgrund der Ergebnisse dieses Experimentes aber naheliegend. Bei einer dem Pilocarpin-Tiermodell entsprechenden Anfallsentstehung in variierenden Regionen des Temporallappens (Toyoda et al. 2013) könnte die Durchtrennung einer Faserbahn immer nur die Ausbreitung einiger Anfälle verhindern. Es ist daher möglich, dass die TPD die Ausbreitung von epileptischen Anfällen, deren Ursprung innerhalb des EC liegt, verhindern würde. Gleichzeitig hätte die TDP dann aber keinen Einfluss auf Anfälle, die z.B. im Subiculum entstehen. Auch wenn der Anfallsursprung im Pilocarpin-Tiermodell variierte, konnte er meist innerhalb des Hippocampus lokalisiert werden (Toyoda et al. 2013). Insofern diese Erkenntnis auf den Menschen übertragbar ist, würde es die Wirksamkeit einer selektiven Amygdalahippokampektomie / temporalen Lobektomie bei einer Mehrzahl der Patienten mit pharmakoresistenter TLE erklären (Jobst und Cascino 2015). Ein multifokaler Anfallsursprung in den meisten Tiermodellen der TLE würde auch erklären, warum der antiepileptogene Effekt einer TPD bisher nur in Experimenten nachgewiesen wurde, in denen ein einzelner künstlich erzeugter Anfallsursprung bestand (Kohler et al. 1978; Ben-Ari et al. 1980b; Savage et al. 1985).

Um zu verifizieren ob die spontanen epileptischen Anfälle im NKTPS-Tiermodell einen variablen Ursprungsort haben, ist die Durchführung weiterer Experimente notwendig. In diesen könnte die Anfallsaktivität im NKTPS Tiermodell mit Tiefenelektroden in verschiedenen Hirnregionen aufgezeichnet werden.

8.3.3 Hypothese I

Die Hauptaussage von Hypothese I kann durch die Ergebnisse dieses Versuchs nur unzureichend überprüft werden. Da die TPD weder die spontane Körnerzellaktivität (Meyer et al. 2016), noch die Epileptogenese messbar beeinflusste, bleibt unklar ob eine Wechselwirkung zwischen diesen besteht.

8.3.4 Die Rolle von „interiktalen“ Potentialen während der Epileptogenese

Die im NKTPS-Tiermodell beobachteten spontanen Körnerzellentladungen weisen Ähnlichkeiten zu „interiktalen“ Potentialen wie Spikes, high-frequency-oscillations (HFO) und fast ripples (FR) auf. Die Assoziation des progredienten Auftretens von Spikes, HFO und FR während der Latenzzeit mit der anschließenden Entstehung spontaner epileptischer Anfälle wurde in mehreren Experimenten bestätigt (Bragin et al.

2000; Bragin et al. 2004; White et al. 2010; Chauviere et al. 2012), sodass diese als potentielle Biomarker der Epileptogenese gelten (Staley et al. 2011; Engel, JR et al. 2013). Die Frequenz dieser „interiktalen“ Potentiale nimmt im Verlauf der Latenzzeit progredient zu und erreicht ihren Höhepunkt kurz vor dem Auftreten des ersten spontanen epileptischen Anfalls (Staley et al. 2011; Chauviere et al. 2012). Dieses progrediente Auftreten der „interiktalen“ Potentiale während der Latenzzeit kann verschieden interpretiert werden:

- Die „interiktalen“ Potentiale verursachen, z.B. durch die Induktion einer verstärkten Axonsprossung, strukturelle Veränderungen und dadurch eine erhöhte Erregbarkeit neuronaler Strukturen. Diese erhöhte Erregbarkeit begünstigt die Generierung weiterer „interiktaler“ Potentiale und schlussendlich die Entstehung spontaner epileptischer Anfälle. **Die „interiktalen“ Potentiale selbst begünstigen die Epileptogenese** (Carmichael und Chesselet 2002; Dzhala und Staley 2003; Staley et al. 2005; Staley und Dudek 2006).
- **Die „interiktalen“ Potentiale haben keinen Einfluss auf die Epileptogenese.** Ihr progredientes Auftreten ist in der Progredienz der ihnen zugrundeliegenden Pathologie begründet (Gotman 1984).
- Elektrophysiologische Experimente haben ergeben, dass die Erregbarkeit von Neuronen kurz nach dem Auftreten eines „interiktalen“ Spikes reduziert ist (Engel, JR und Ackermann 1980; Curtis et al. 2001; Curtis et al. 2005). Spikes scheinen also eine antiepileptische Wirkung zu besitzen und das Auftreten epileptischer Anfälle zu unterdrücken (Swartzwelder et al. 1987; Curtis und Avanzini 2001). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung kann **das progrediente Auftreten der „interiktalen“ Potentiale im Verlauf der Latenzzeit auch als Ausdruck einer antiepileptischen Gegenregulation** verstanden werden (Curtis und Avanzini 2001; Avoli et al. 2006).

Aktuelle Experimente zeigen, dass es verschiedene Spike-Varianten gibt, die unterschiedlich starke inhibitorische Eigenschaften aufweisen (Chauviere et al. 2012). Hierbei wurden zu Beginn der Latenzperiode vor allem Spikes mit einer zusätzlichen Welle, welche der Ausdruck einer ausgeprägten inhibitorischen Komponente ist, aufgezeichnet. Kurz vor dem Auftreten des ersten spontanen epileptischen Anfalls wurden vor allem Spikes ohne eine solche Welle aufgezeichnet (Chauviere et al. 2012). Insgesamt gibt es also Spikes mit eher antiepileptischen

Eigenschaften und Spikes mit proepileptischen Eigenschaften. Zu welcher Gruppe die in diesem Experiment beobachteten spontanen Körnerzellpotentiale gehören, wurde nicht untersucht. Allerdings können die spontanen Körnerzellpotentiale schon während der Latenzzeit beobachtet werden und sind daher sowohl potentielle Biomarker der Epileptogenese, als auch ein potentielles pathologisches Korrelat.

8.3.5 Das Kindling-Phänomen als Mechanismus der Epileptogenese?

Im Kindling-Tiermodell entsteht ein Kindling-Effekt nur durch repetitive Stimulationen, welche bereits initial eine epileptiforme Nachladung induzieren (McIntyre et al. 2002; McIntyre 2006; Bertram 2007). Die in diesem Versuch beobachteten spontanen Körnerzellpotentialen haben keine epileptiformen Nachladungen induziert (Abbildung 4; im Vergleich dazu Nachladungen während der TPS in Abbildung 13). Künstlich erzeugte Potentiale, mit ähnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie die im NKTPS Tiermodell beobachteten spontanen Körnerzellpotentiale, würden dementsprechend keinen Kindling-Effekt induzieren. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die im NKTPS Tiermodell beobachteten spontanen Körnerzellpotentiale die Epileptogenese durch die Induktion eines Kindling-Effektes beeinflussen.

Die Hypothese, dass ein dem Kindling-Phänomen entsprechender Prozess ein wichtiger Bestandteil der Epileptogenese ist, entstand durch die Beobachtung nicht-convulsiver epileptischen Anfällen vor dem ersten Auftreten convulsiver epileptischer Anfälle (Bertram und Cornett 1993; Bertram und Cornett 1994). Die klinische Anfallsschwere nahm in einigen Tierversuchen im Verlauf progredient zu, bis einige Wochen nach dem ersten convulsiven Anfall eine Plateauphase erreicht wurde (Bertram und Cornett 1993; Bertram und Cornett 1994; Bertram 2007; Bumanglag und Sloviter 2008). Diese progrediente Zunahme der klinischen Schwere von anfangs nicht-convulsiven epileptischen Anfällen wird auch im Kindling-Tiermodell beobachtet (McIntyre 2006; Bertram 2007). Daher erfolgte die Schlussfolgerung, dass während der Latenzzeit ein dem Kindling-Phänomen ähnlicher Prozess stattfindet. Die Beobachtung von anfangs nicht-convulsiven epileptischen Anfällen, deren klinische Anfallsschwere im Verlauf progredient zunahm, konnte im NKTPS-Tiermodell nicht reproduziert werden (Tabelle 8). Es

ist daher insgesamt unwahrscheinlich, dass ein dem Kindling-Phänomen entsprechender Prozess ein wichtiger Bestandteil der Epileptogenese im NKTPS-Tiermodell ist.

Zusätzlich gibt es einige Aspekte des Kindling-Tiermodells, die gegen dessen Validität als Modell der TLE sprechen. Im Kindling-Tiermodell entstehen normalerweise keine spontanen epileptischen Anfälle (Bertram 2007). Da das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle das Hauptkriterium für die Diagnosestellung einer Epilepsie ist (Fisher et al. 2014), erscheint ein Tiermodell der Epilepsie ohne spontane epileptische Anfälle als unzulänglich. Als Gegenargument gegen diesen Kritikpunkt wird häufig auf die spontanen epileptischen Anfälle verwiesen, welche nach über 300 Stimulationen im Kindling-Tiermodell beobachtet wurden (Pinel und Rovner 1978). Die Ätiologie dieser spontanen Anfälle ist allerdings umstritten. So gibt es Hinweise darauf, dass die spontanen Anfälle im Kindling-Tiermodell nicht durch die repetitiven Stimulationen, sondern durch das während der Elektrodenimplantation entstehende offene SHT induziert werden (Löscher und Brandt 2010).

Der zweite große Nachteil des Kindling-Tiermodells ist das Fehlen der typischen chronischen histologischen Veränderungen einer HS (Löscher und Brandt 2010). Andere für die Epileptogenese typischen histologischen Veränderungen, wie eine Verbreiterung der Körnerzellschicht, bestehen im Kindling Tiermodell nicht dauerhaft (Singh et al. 2013) und sind daher eher als akute Reaktion des Gewebes nach epileptischen Anfällen zu interpretieren.

Das Kindling-Tiermodell ist insgesamt nicht in der Lage, einige der für die TLE mit HS typischen Veränderungen darzustellen. Dies spricht gegen die relevante Beteiligung eines dem Kindling-Phänomen ähnlichen Prozesses an der Entstehung spontaner Anfälle und an der Verursachung permanenter histologischer Veränderungen. Die Rolle eines dem Kindling-Phänomen ähnlichen Prozesses bei der „Ausreifung“ einer anfangs subklinischen Epilepsie (Sloviter et al. 2012) ist weiterhin denkbar, aber wurde durch die Ergebnisse diese Studie nicht unterstützt.

8.4 Kernaussage und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Epileptogenese im NKTPS Tiermodell unabhängig von einer Intaktheit der entorhinalen Afferenzen

des GD stattfindet. Die Epileptogenese basiert in diesem Tiermodell also nicht ausschließlich auf einem pathophysiologischen Zusammenspiel zwischen EC und Hippocampus, sondern scheint mit der Veränderung eines größeren neuronalen Netzwerkes einherzugehen. Insgesamt sind die Ergebnisse dieses Versuches gut mit dem Konzept der TLE mit HS als multifokaler, oder sogar generalisierter Erkrankung des ZNS vereinbar. Die im NKTPS-Tiermodell während der Latenzzeit beobachteten spontanen Körnerzellpotentiale werden nicht durch eine Aktivierung der Körnerzellen über die Fasern des TP evoziert. Ihr genauer Ursprungsort bleibt weiterhin unklar.

Insgesamt sind durch die Beobachtungen während dieses Experimentes weitere wissenschaftliche Fragestellungen entstanden. Da das NKTPS-Tiermodell erst vor wenigen Jahren entwickelt wurde, fehlen noch Studien, die dieses Tiermodell genauer klassifizieren. Die histologischen Veränderungen stellten sich in diesem Versuch deutlich diverser als in vormaligen Experimenten dar. Daher erfordert es weitere Experimente um festzustellen, welche Formen der HS sich im NKTPS-Tiermodell ausbilden und welche Faktoren dieses beeinflussen. Weiterhin ist eine genauere elektrophysiologische Untersuchung der epileptiformen Ereignisse im NKTPS-Tiermodell notwendig. Eine Ursprungsbestimmung der epileptischen Anfälle und der „interiktalen“ Potentiale könnte z.B. durch die Verwendung hochauflösender Tetroden erfolgen. Zusätzlich gab es in diesem Versuch Hinweise darauf, dass zu Beginn der Latenzzeit verabreichtes Ketamin einen Effekt auf die Epileptogenese im NKTPS-Tiermodell hat. Dieser Hinweis sollte unter standardisierten Bedingungen überprüft werden.

9 Literaturverzeichnis

ABC-Technik - Lexikon der Biochemie. Online verfügbar unter <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/abc-technik/9>, zuletzt geprüft am 28.09.2015.

Abercrombie, M. (1946): Estimation of nuclear population from microtome sections. In: *The Anatomical record* 94, S. 239–247.

Andersen, P.; Bliss, T.V.P.; Skrede, K. K. (1971): Unit analysis of hippocampal population spikes. In: *Exp Brain Res* 13 (2), S. 208–221. DOI: 10.1007/BF00234086.

Andersen, P.; Holmqvist, B.; Voorhoeve, P. E. (1966): Entorhinal activation of dentate granule cells. In: *Acta physiologica Scandinavica* 66 (4), S. 448–460. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1966.tb03223.x.

Avoli, Massimo; Biagini, Giuseppe; Curtis, M. de (2006): Do interictal spikes sustain seizures and epileptogenesis? In: *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 6 (6), S. 203–207. DOI: 10.1111/j.1535-7511.2006.00146.x.

Banerjee, Poonam Nina; Filippi, David; Allen Hauser, W. (2009): The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. In: *Epilepsy research* 85 (1), S. 31–45. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2009.03.003.

Barbarosie, M.; Avoli, M. (1997): CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (23), S. 9308–9314.

Bartheld, C. von (2002): Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. In: *Histology and histopathology* 17 (2), S. 639–648.

Bartolomei, Fabrice; Khalil, Mouhamad; Wendling, Fabrice; Sontheimer, Anna; Regis, Jean; Ranjeva, Jean-Phillipe et al. (2005): Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. In: *Epilepsia* 46 (5), S. 677–687. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.43804.x.

Bear, J.; Lothman, E. W. (1993): An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices. In: *Epilepsy research* 14 (3), S. 183–193.

Behr, J.; Lyson, K. J.; Mody, I. (1998): Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. In: *Journal of neurophysiology* 79 (4), S. 1726–1732.

Ben-Ari, Y.; Lagowska, J. (1978): Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid. In: *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 287 (8), S. 813–816.

Ben-Ari, Y.; Tremblay, E.; Ottersen, O. P. (1980a): Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. In: *Neuroscience* 5 (3), S. 515–528.

Ben-Ari, Y.; Tremblay, E.; Ottersen, O. P.; Meldrum, B. S. (1980b): The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. In: *Brain research* 191 (1), S. 79–97.

Ben-Ari, Yehezkel; Dudek, F. Edward (2010): Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after. In: *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 10 (5), S. 118–125. DOI: 10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x.

- Berg, A.; Berkovic, S.; Brodie, M.; Buchhalter, J.; Cross, J.; van Emde Boas, W. et al. (2010): Revidierte Terminologie und Konzepte zur Einteilung von epileptischen Anfällen und Epilepsien. Bericht der Klassifikations- und Terminologiekommision der Internationalen Liga gegen Epilepsie, 2005–2009. In: *Akt Neurol* 37 (03), S. 120–130. DOI: 10.1055/s-0030-1248426.
- Bernasconi, N.; Bernasconi, A.; Andermann, F.; Dubeau, F.; Feindel, W.; Reutens, D. C. (1999): Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. In: *Neurology* 52 (9), S. 1870–1876.
- Bernasconi, N.; Bernasconi, A.; Caramanos, Z.; Dubeau, F.; Richardson, J.; Andermann, F.; Arnold, D. L. (2001): Entorhinal cortex atrophy in epilepsy patients exhibiting normal hippocampal volumes. In: *Neurology* 56 (10), S. 1335–1339.
- Bernasconi, Neda; Andermann, Frederick; Arnold, Douglas L.; Bernasconi, Andrea (2003): Entorhinal cortex MRI assessment in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. In: *Epilepsia* 44 (8), S. 1070–1074.
- Bernhardt, Boris C.; Bonilha, Leonardo; Gross, Donald W. (2015): Network analysis for a network disorder: The emerging role of graph theory in the study of epilepsy. In: *Epilepsy & behavior : E&B*. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.06.005.
- Bertram, E. H.; Cornett, J. (1993): The ontogeny of seizures in a rat model of limbic epilepsy: evidence for a kindling process in the development of chronic spontaneous seizures. In: *Brain research* 625 (2), S. 295–300.
- Bertram, E. H.; Cornett, J. F. (1994): The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. In: *Brain research* 661 (1-2), S. 157–162.
- Bertram, Edward (2007): The relevance of kindling for human epilepsy. In: *Epilepsia* 48 Suppl 2, S. 65–74.
- Best, N.; Mitchell, J.; Baimbridge, K. G.; Wheal, H. V. (1993): Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. In: *Neuroscience letters* 155 (1), S. 1–6.
- Blumcke, Ingmar; Coras, Roland; Miyata, Hajime; Ozkara, Cigdem (2012): Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 22 (3), S. 402–411. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00583.x.
- Blumcke, Ingmar; Pauli, Elisabeth; Clusmann, Hans; Schramm, Johannes; Becker, Albert; Elger, Christian et al. (2007): A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. In: *Acta neuropathologica* 113 (3), S. 235–244. DOI: 10.1007/s00401-006-0187-0.
- Blumcke, Ingmar; Thom, Maria; Aronica, Eleonora; Armstrong, Dawna D.; Bartolomei, Fabrice; Bernasconi, Andrea et al. (2013): International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. In: *Epilepsia* 54 (7), S. 1315–1329. DOI: 10.1111/epi.12220.
- Blumenfeld, Hal; Lampert, Angelika; Klein, Joshua P.; Mission, John; Chen, Michael C.; Rivera, Maritza et al. (2009): Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis. In: *Epilepsia* 50 (1), S. 44–55. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01710.x.
- Boison, Detlev (2015): Adenosinergic signaling in epilepsy. In: *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.046.

- Bower, Mark R.; Buckmaster, Paul S. (2008): Changes in granule cell firing rates precede locally recorded spontaneous seizures by minutes in an animal model of temporal lobe epilepsy. In: *Journal of neurophysiology* 99 (5), S. 2431–2442. DOI: 10.1152/jn.01369.2007.
- Boyden, Edward S.; Zhang, Feng; Bamberg, Ernst; Nagel, Georg; Deisseroth, Karl (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. In: *Nature neuroscience* 8 (9), S. 1263–1268. DOI: 10.1038/nn1525.
- Bragin, A.; Engel, J., JR; Wilson, C. L.; Fried, I.; Buzsaki, G. (1999): High-frequency oscillations in human brain. In: *Hippocampus* 9 (2), S. 137–142. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<137::AID-HIPO5>3.0.CO;2-0.
- Bragin, A.; Wilson, C. L.; Engel, J., JR (2000): Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron clusters: a hypothesis. In: *Epilepsia* 41 Suppl 6, S. S144-52.
- Bragin, Anatol; Azizyan, Avetis; Almajano, Joyel; Wilson, Charles L.; Engel, Jerome, JR (2005): Analysis of chronic seizure onsets after intrahippocampal kainic acid injection in freely moving rats. In: *Epilepsia* 46 (10), S. 1592–1598. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.00268.x.
- Bragin, Anatol; Wilson, Charles L.; Almajano, Joyel; Mody, Istvan; Engel, Jerome, JR (2004): High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. In: *Epilepsia* 45 (9), S. 1017–1023. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.17004.x.
- Buckmaster, P. S.; Dudek, F. E. (1997): Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. In: *The Journal of comparative neurology* 385 (3), S. 385–404.
- Bumanglag, Argyle V.; Sloviter, Robert S. (2008): Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. In: *The Journal of comparative neurology* 510 (6), S. 561–580. DOI: 10.1002/cne.21801.
- Calcagnotto, M. E.; Barbarosie, M.; Avoli, M. (2000): Hippocampus-entorhinal cortex loop and seizure generation in the young rodent limbic system. In: *Journal of neurophysiology* 83 (5), S. 3183–3187.
- Carmichael, S. Thomas; Chesselet, Marie-Francoise (2002): Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (14), S. 6062–6070.
- CDC (2012): Epilepsy in adults and access to care--United States, 2010. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 61 (45), S. 909–913.
- Chauviere, Laetitia; Doublet, Thomas; Ghestem, Antoine; Siyoucef, Safia S.; Wendling, Fabrice; Huys, Raoul et al. (2012): Changes in interictal spike features precede the onset of temporal lobe epilepsy. In: *Annals of neurology* 71 (6), S. 805–814. DOI: 10.1002/ana.23549.
- Chung, Sungkwon; Spruston, Nelson; Koh, Sookyong (2015): Age-dependent changes in intrinsic neuronal excitability in subiculum after status epilepticus. In: *PloS one* 10 (3), S. e0119411. DOI: 10.1371/journal.pone.0119411.
- Claassen, J.; Mayer, S. A.; Kowalski, R. G.; Emerson, R. G.; Hirsch, L. J. (2004): Detection of electrographic seizures with continuous EEG monitoring in critically ill patients. In: *Neurology* 62 (10), S. 1743–1748.

- Coras, R.; Blumcke, I. (2015): Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment. In: *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.003.
- Coulter, Douglas A.; Carlson, Gregory C. (2007): Functional regulation of the dentate gyrus by GABA-mediated inhibition. In: *Progress in brain research* 163, S. 235–243. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63014-3.
- Cunha, Alexandra Olimpio Siqueira; Mortari, Marcia Renata; Liberato, Jose Luiz; dos Santos, Wagner Ferreira (2009): Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. In: *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 104 (6), S. 470–477. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2009.00403.x.
- Curtis, M. de; Avanzini, G. (2001): Interictal spikes in focal epileptogenesis. In: *Progress in neurobiology* 63 (5), S. 541–567.
- Curtis, M. de; Librizzi, L.; Biella, G. (2001): Discharge threshold is enhanced for several seconds after a single interictal spike in a model of focal epileptogenesis. In: *The European journal of neuroscience* 14 (1), S. 174–178.
- Curtis, Marco; Tassi, Laura; Lo Russo, Giorgio; Mai, Roberto; Cossu, Massimo; Francione, Stefano (2005): Increased discharge threshold after an interictal spike in human focal epilepsy. In: *The European journal of neuroscience* 22 (11), S. 2971–2976. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04458.x.
- Dehn, Doris; Burbach, Guido J.; Schafer, Ruth; Deller, Thomas (2006): NG2 upregulation in the denervated rat fascia dentata following unilateral entorhinal cortex lesion. In: *Glia* 53 (5), S. 491–500. DOI: 10.1002/glia.20307.
- Deisseroth, Karl (2011): Optogenetics. In: *Nature methods* 8 (1), S. 26–29. DOI: 10.1038/nmeth.f.324.
- Del Felice, Alessandra; Beghi, Ettore; Boero, Giovanni; La Neve, Angela; Bogliun, Graziella; Palo, Alessia de; Specchio, Luigi M. (2010): Early versus late remission in a cohort of patients with newly diagnosed epilepsy. In: *Epilepsia* 51 (1), S. 37–42. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02141.x.
- Del Turco, Domenico; Woods, Alisa G.; Gebhardt, Carl; Phinney, Amie L.; Jucker, Mathias; Frotscher, Michael; Deller, Thomas (2003): Comparison of commissural sprouting in the mouse and rat fascia dentata after entorhinal cortex lesion. In: *Hippocampus* 13 (6), S. 685–699. DOI: 10.1002/hipo.10118.
- Deller, T.; Frotscher, M.; Nitsch, R. (1995): Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus. In: *J Neurosci* 15 (10), S. 6868–6878.
- Deller, Thomas; Bas Orth, Carlos; Vlachos, Andreas; Merten, Tobias; Del Turco, Domenico; Dehn, Doris et al. (2006): Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. In: *J Comp Neurol* 499 (3), S. 471–484. DOI: 10.1002/cne.21103.
- Dichter, Marc A. (2009): Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. In: *Arch Neurol* 66 (4), S. 443–447. DOI: 10.1001/archneurol.2009.10.
- Dorandeu, Frederic; Barbier, Laure; Dhote, Franck; Testylier, Guy; Carpentier, Pierre (2013): Ketamine combinations for the field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Review of current data and perspectives. In: *Chemico-biological interactions* 203 (1), S. 154–159. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.09.013.

- Drexel, Meinrad; Preidt, Adrian Patrick; Sperk, Gunther (2012): Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. In: *Neuropharmacology* 63 (5), S. 806–817. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.009.
- Du, F.; Eid, T.; Lothman, E. W.; Kohler, C.; Schwarcz, R. (1995): Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurosci* 15 (10), S. 6301–6313.
- Du, F.; Whetsell, W. O., JR; Abou-Khalil, B.; Blumenkopf, B.; Lothman, E. W.; Schwarcz, R. (1993): Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsy research* 16 (3), S. 223–233.
- Duan, Wei; Zhang, Yu-Ping; Hou, Zhi; Huang, Chen; Zhu, He; Zhang, Chun-Qing; Yin, Qing (2015): Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. In: *Molecular neurobiology*. DOI: 10.1007/s12035-015-9122-5.
- Dudek, F. Edward; Staley, Kevin J. (2011): The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. In: *Neuroscience letters* 497 (3), S. 240–246. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.071.
- Dudek, F. Edward; Staley, Kevin J. (2012): The Time Course and Circuit Mechanisms of Acquired Epileptogenesis. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. In: Jeffrey L. Noebels, Massimo Avoli, Michael A. Rogawski, Richard W. Olsen und Antonio V. Delgado-Escueta (Hg.): *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4. Aufl. Bethesda (MD).
- Dzhala, Volodymyr I.; Staley, Kevin J. (2003): Transition from interictal to ictal activity in limbic networks in vitro. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (21), S. 7873–7880.
- Engel, J., JR; Ackermann, R. F. (1980): Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased, epileptogenicity in amygdaloid kindled rats. In: *Brain research* 190 (2), S. 543–548.
- Engel, Jerome, JR; Pitkanen, Asla; Loeb, Jeffrey A.; Dudek, F. Edward; Bertram, Edward H. 3rd; Cole, Andrew J. et al. (2013): Epilepsy biomarkers. In: *Epilepsia* 54 Suppl 4, S. 61–69. DOI: 10.1111/epi.12299.
- Fazel, Seena; Wolf, Achim; Langstrom, Niklas; Newton, Charles R.; Lichtenstein, Paul (2013): Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study. In: *Lancet (London, England)* 382 (9905), S. 1646–1654. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60899-5.
- Fiest, Kirsten M.; Dykeman, Jonathan; Patten, Scott B.; Wiebe, Samuel; Kaplan, Gilaad G.; Maxwell, Colleen J. et al. (2013): Depression in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. In: *Neurology* 80 (6), S. 590–599. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31827b1ae0.
- Fisher, Robert S.; Acevedo, Carlos; Arzimanoglou, Alexis; Bogacz, Alicia; Cross, J. Helen; Elger, Christian E. et al. (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. In: *Epilepsia* 55 (4), S. 475–482. DOI: 10.1111/epi.12550.
- Fisher, Robert S.; van Emde Boas, Walter; Blume, Warren; Elger, Christian; Genton, Pierre; Lee, Phillip; Engel, Jerome, JR (2005): Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). In: *Epilepsia* 46 (4), S. 470–472. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.

- French, J. A.; Williamson, P. D.; Thadani, V. M.; Darcey, T. M.; Mattson, R. H.; Spencer, S. S.; Spencer, D. D. (1993): Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. In: *Annals of neurology* 34 (6), S. 774–780. DOI: 10.1002/ana.410340604.
- Fujita, Satoshi; Toyoda, Izumi; Thamattoor, Ajoy K.; Buckmaster, Paul S. (2014): Preictal activity of subicular, CA1, and dentate gyrus principal neurons in the dorsal hippocampus before spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (50), S. 16671–16687. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0584-14.2014.
- Giblin, Kathryn A.; Blumenfeld, Hal (2010): Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. In: *Neuroscientist* 16 (3), S. 253–275. DOI: 10.1177/1073858409354385.
- Goddard, G. V. (1967): Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. In: *Nature* 214 (5092), S. 1020–1021.
- Goldberg, Ethan M.; Coulter, Douglas A. (2013): Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (5), S. 337–349. DOI: 10.1038/nrn3482.
- Golub, Victoria M.; Brewer, Jonathan; Wu, Xin; Kuruba, Ramkumar; Short, Jenessa; Manchi, Maunica et al. (2015): Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration. In: *Frontiers in aging neuroscience* 7, S. 196. DOI: 10.3389/fnagi.2015.00196.
- Gorter, J. A.; van Vliet, E. A.; Aronica, E.; Lopes da Silva, F H (2001): Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. In: *The European journal of neuroscience* 13 (4), S. 657–669.
- Gorter, Jan A.; van Vliet, Erwin A.; Aronica, Eleonora (2015a): Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 49, S. 13–16. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.04.047.
- Gorter, Jan A.; van Vliet, Erwin A.; Lopes da Silva, Fernando H (2015b): Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? In: *Journal of neuroscience methods*. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.025.
- Gotman, J. (1984): Relationships between triggered seizures, spontaneous seizures, and interictal spiking in the kindling model of epilepsy. In: *Experimental neurology* 84 (2), S. 259–273.
- Gowers, William Richard (1881): Epilepsy and other chronic convulsive diseases : their causes, symptoms, & treatment. London: Churchill. Online verfügbar unter <https://archive.org/details/epilepsyotherchr00goweuoft>.
- Gundersen, H. J.; Bagger, P.; Bendtsen, T. F.; Evans, S. M.; Korbo, L.; Marcussen, N. et al. (1988): The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 96 (10), S. 857–881.
- Haneef, Zulfi; Lenartowicz, Agatha; Yeh, Hsiang J.; Levin, Harvey S.; Engel, Jerome, JR; Stern, John M. (2014): Functional connectivity of hippocampal networks in temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 55 (1), S. 137–145. DOI: 10.1111/epi.12476.
- Harvey, Brian D.; Sloviter, Robert S. (2005): Hippocampal granule cell activity and c-Fos expression during spontaneous seizures in awake, chronically epileptic, pilocarpine-treated rats:

- implications for hippocampal epileptogenesis. In: *The Journal of comparative neurology* 488 (4), S. 442–463. DOI: 10.1002/cne.20594.
- Heinemann, U.; Beck, H.; Dreier, J. P.; Ficker, E.; Stabel, J.; Zhang, C. L. (1992): The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. In: *Epilepsy research. Supplement* 7, S. 273–280.
- Heng, Kathleen; Haney, Megan M.; Buckmaster, Paul S. (2013): High-dose rapamycin blocks mossy fiber sprouting but not seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 54 (9), S. 1535–1541. DOI: 10.1111/epi.12246.
- Hjorth-Simonsen, A.; Jeune, B. (1972): Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. In: *J Comp Neurol* 144 (2), S. 215–232. DOI: 10.1002/cne.901440206.
- Hort, J.; Brozek, G.; Mares, P.; Langmeier, M.; Komarek, V. (1999): Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. In: *Epilepsia* 40 (9), S. 1177–1183.
- Houser, C. R. (1990): Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. In: *Brain research* 535 (2), S. 195–204.
- Hsu, S. M.; Raine, L. (1981): Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 29 (11), S. 1349–1353.
- Immunhistologie - Pathologie-Online. Online verfügbar unter http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/#Die_3-Schritt-indirekte_Methode, zuletzt geprüft am 25.09.2015.
- Insausti, R.; Amaral, D. G.; Cowan, W. M. (1987): The entorhinal cortex of the monkey: II. Cortical afferents. In: *The Journal of comparative neurology* 264 (3), S. 356–395. DOI: 10.1002/cne.902640306.
- Ishizuka, N.; Weber, J.; Amaral, D. G. (1990): Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 295 (4), S. 580–623. DOI: 10.1002/cne.902950407.
- Jin, Seung-Hyun; Jeong, Woorim; Chung, Chun Kee (2015): Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is a network disorder with altered cortical hubs. In: *Epilepsia* 56 (5), S. 772–779. DOI: 10.1111/epi.12966.
- Jinde, Seiichiro; Zsiros, Veronika; Nakazawa, Kazu (2013): Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. In: *Frontiers in neural circuits* 7, S. 14. DOI: 10.3389/fncir.2013.00014.
- Jobst, Barbara C.; Cascino, Gregory D. (2015): Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. In: *JAMA* 313 (3), S. 285–293. DOI: 10.1001/jama.2014.17426.
- Jutila, L.; Ylinen, A.; Partanen, K.; Alafuzoff, I.; Mervaala, E.; Partanen, J. et al. (2001): MR volumetry of the entorhinal, perirhinal, and temporopolar cortices in drug-refractory temporal lobe epilepsy. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 22 (8), S. 1490–1501.
- Kelley, M. S.; Steward, O. (1996): The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: physiological events at the time of the lesion and during the early postlesion period. In: *Experimental neurology* 139 (1), S. 73–82. DOI: 10.1006/exnr.1996.0082.

- Kharatishvili, Irina; Pitkanen, Asla (2010): Association of the severity of cortical damage with the occurrence of spontaneous seizures and hyperexcitability in an animal model of post-traumatic epilepsy. In: *Epilepsy research* 90 (1-2), S. 47–59. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2010.03.007.
- Kienzler, Friederike; Norwood, Braxton A.; Sloviter, Robert S. (2009): Hippocampal injury, atrophy, synaptic reorganization, and epileptogenesis after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in the mouse. In: *The Journal of comparative neurology* 515 (2), S. 181–196. DOI: 10.1002/cne.22059.
- Kobayashi, Masayuki; Buckmaster, Paul S. (2003): Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (6), S. 2440–2452.
- Kobayashi, Masayuki; Wen, Xiling; Buckmaster, Paul S. (2003): Reduced inhibition and increased output of layer II neurons in the medial entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurosci* 23 (24), S. 8471–8479.
- Kohler, C.; Schwarcz, R.; Fuxe, K. (1978): Perforant path transections protect hippocampal granule cells from kainate lesion. In: *Neurosci Lett* 10 (3), S. 241–246.
- Kovac, Adam D.; Kwidzinski, Erik; Heimrich, Bernd; Bittigau, Petra; Deller, Thomas; Nitsch, Robert; Bechmann, Ingo (2004): Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14 (3), S. 249–257.
- Krook-Magnuson, Esther; Armstrong, Caren; Oijala, Mikko; Soltesz, Ivan (2013): On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. In: *Nature communications* 4, S. 1376. DOI: 10.1038/ncomms2376.
- Kumar, Sanjay S.; Buckmaster, Paul S. (2006): Hyperexcitability, interneurons, and loss of GABAergic synapses in entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurosci* 26 (17), S. 4613–4623. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0064-06.2006.
- Kwan, Patrick; Arzimanoglou, Alexis; Berg, Anne T.; Brodie, Martin J.; Allen Hauser, W.; Mathern, Gary et al. (2010): Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. In: *Epilepsia* 51 (6), S. 1069–1077. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x.
- Laxer, Kenneth D.; Trinka, Eugen; Hirsch, Lawrence J.; Cendes, Fernando; Langfitt, John; Delanty, Norman et al. (2014): The consequences of refractory epilepsy and its treatment. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 37, S. 59–70. DOI: 10.1016/j.yebeh.2014.05.031.
- Lemos, T.; Cavalheiro, E. A. (1995): Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. In: *Experimental brain research* 102 (3), S. 423–428.
- Lerche, H.; Vezzani, A.; Beck, H.; Blümcke, I.; Weber, Y.; Elger, C. (2011): Neue Entwicklungen der Epileptogenese und therapeutische Perspektiven. In: *Nervenarzt* 82 (8), S. 978–985. DOI: 10.1007/s00115-011-3260-4.
- Lerche, Holger; Shah, Mala; Beck, Heinz; Noebels, Jeff; Johnston, Dan; Vincent, Angela (2013): Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. In: *The Journal of physiology* 591 (Pt 4), S. 753–764. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.240606.
- Levesque, Maxime; Avoli, Massimo; Bernard, Christophe (2015): Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. In: *Journal of neuroscience methods*. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.009.

- Lewis, Darrell V.; Shinnar, Shlomo; Hesdorffer, Dale C.; Bagiella, Emilia; Bello, Jacqueline A.; Chan, Stephen et al. (2014): Hippocampal sclerosis after febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. In: *Annals of neurology* 75 (2), S. 178–185. DOI: 10.1002/ana.24081.
- Lewis, Frederic T. (1923): The significance of the term Hippocampus. In: *J. Comp. Neurol.* 35 (3), S. 213–230. DOI: 10.1002/cne.900350303.
- Livingston, R B; French, J D; Richland, K J; Konigsmark, B (1956): Experimental studies on cortical epileptogenesis. In: *Transactions of the American Neurological Association* (81st Meeting), S. 43–46.
- Lorente de Nó, R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. In: *J. Psychol. Neurol.* 46, S. 113–177.
- Löscher, Wolfgang; Brandt, Claudia (2010): Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. In: *Pharmacol. Rev.* 62 (4), S. 668–700. DOI: 10.1124/pr.110.003046.
- Löscher, Wolfgang; Hirsch, Lawrence J.; Schmidt, Dieter (2015): The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy - Traditional view versus new concepts. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 52 (Pt A), S. 78–92. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.08.037.
- Löscher, Wolfgang; Puskarjov, Martin; Kaila, Kai (2013): Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. In: *Neuropharmacology* 69, S. 62–74. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.045.
- Lothman, E. W.; Bertram, E. H.; Bekenstein, J. W.; Perlin, J. B. (1989): Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. In: *Epilepsy research* 3 (2), S. 107–119.
- Lothman, E. W.; Stringer, J. L.; Bertram, E. H. (1992): The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. In: *Epilepsy research. Supplement* 7, S. 301–313.
- Lu, Li; Leutgeb, Jill K.; Tsao, Albert; Henriksen, Espen J.; Leutgeb, Stefan; Barnes, Carol A. et al. (2013): Impaired hippocampal rate coding after lesions of the lateral entorhinal cortex. In: *Nature neuroscience* 16 (8), S. 1085–1093. DOI: 10.1038/nn.3462.
- Manford, M.; Hart, Y. M.; Sander, J. W.; Shorvon, S. D. (1992a): National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population. In: *Neurology* 42 (10), S. 1911–1917.
- Manford, M.; Hart, Y. M.; Sander, J. W.; Shorvon, S. D. (1992b): The National General Practice Study of Epilepsy. The syndromic classification of the International League Against Epilepsy applied to epilepsy in a general population. In: *Archives of neurology* 49 (8), S. 801–808.
- Margerison, J. H.; Corsellis, J. A. (1966): Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. In: *Brain : a journal of neurology* 89 (3), S. 499–530.
- Matthews, D. A.; Cotman, C.; Lynch, G. (1976): An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. In: *Brain research* 115 (1), S. 1–21.

- Maxeiner, Stephan; Glassmann, Alexander; Kao, Hung-Teh; Schilling, Karl (2014): The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3. In: *Histochemistry and cell biology* 141 (1), S. 43–55. DOI: 10.1007/s00418-013-1159-9.
- McIntosh, T. K.; Vink, R.; Noble, L.; Yamakami, I.; Fernyak, S.; Soares, H.; Faden, A. L. (1989): Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. In: *Neuroscience* 28 (1), S. 233–244.
- McIntyre, Dan C. (2006): The Kindling Phenomenon. In: *Models of Seizures and Epilepsy*: Elsevier, S. 351–363.
- McIntyre, Dan C.; Poulter, Michael O.; Gilby, Krista (2002): Kindling: some old and some new. In: *Epilepsy Res* 50 (1-2), S. 79–92.
- Meyer, Martin; Kienzler-Norwood, Friederike; Bauer, Sebastian; Rosenow, Felix; Norwood, Braxton A. (2016): Removing entorhinal cortex input to the dentate gyrus does not impede low frequency oscillations, an EEG-biomarker of hippocampal epileptogenesis. In: *Scientific reports* 6, S. 25660. DOI: 10.1038/srep25660.
- Miller, Daniel J.; Balaram, Pooja; Young, Nicole A.; Kaas, Jon H. (2014): Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. In: *Frontiers in neuroanatomy* 8, S. 36. DOI: 10.3389/fnana.2014.00036.
- Moser, Edvard I.; Roudi, Yasser; Witter, Menno P.; Kentros, Clifford; Bonhoeffer, Tobias; Moser, May-Britt (2014): Grid cells and cortical representation. In: *Nat Rev Neurosci* 15 (7), S. 466–481. DOI: 10.1038/nrn3766.
- Mullen, R. J.; Buck, C. R.; Smith, A. M. (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. In: *Development (Cambridge, England)* 116 (1), S. 201–211.
- Nadler, J. V.; Perry, B. W.; Cotman, C. W. (1980): Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. In: *Brain research* 182 (1), S. 1–9.
- Nevalainen, Olli; Ansakorpi, Hanna; Simola, Mikko; Raitanen, Jani; Isojarvi, Jouko; Artama, Miia; Auvinen, Anssi (2014): Epilepsy-related clinical characteristics and mortality: a systematic review and meta-analysis. In: *Neurology* 83 (21), S. 1968–1977. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001005.
- Newton, Charles R.; Garcia, Hector H. (2012): Epilepsy in poor regions of the world. In: *Lancet (London, England)* 380 (9848), S. 1193–1201. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61381-6.
- Ngugi, Anthony K.; Bottomley, Christian; Kleinschmidt, Immo; Sander, Josemir W.; Newton, Charles R. (2010): Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. In: *Epilepsia* 51 (5), S. 883–890. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x.
- NINDS (2013): 2014 NINDS Benchmarks for Epilepsy Research : National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). Online verfügbar unter <http://www.ninds.nih.gov/research/epilepsyweb/2014benchmarks.htm>, zuletzt geprüft am 17.11.2015.
- Nissl-Färbung - Lexikon der Neurowissenschaft (2015). Online verfügbar unter <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/nissl-faerbung/8831>, zuletzt aktualisiert am 30.09.2015, zuletzt geprüft am 30.09.2015.
- Norwood, Braxton A.; Bauer, Sebastian; Wegner, Sven; Hamer, Hajo M.; Oertel, Wolfgang H.; Sloviter, Robert S.; Rosenow, Felix (2011): Electrical stimulation-induced seizures in rats:

a "dose-response" study on resultant neurodegeneration. In: *Epilepsia* 52 (9), S. e109-12. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03159.x.

Norwood, Braxton A.; Bumanglag, Argyle V.; Osculati, Francesco; Sbarbati, Andrea; Marzola, Pasquina; Nicolato, Elena et al. (2010): Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single "cryptic" episode of focal hippocampal excitation in awake rats. In: *J Comp Neurol* 518 (16), S. 3381–3407. DOI: 10.1002/cne.22406.

O'Dell, Casey M.; Das, Arabinda; Wallace, Gerald, 4th.; Ray, Swapan K.; Banik, Naren L. (2012): Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. In: *Journal of neuroscience research* 90 (5), S. 913–924. DOI: 10.1002/jnr.22829.

Pathak, Hemal R.; Weissinger, Florian; Terunuma, Miho; Carlson, Gregory C.; Hsu, Fu-Chun; Moss, Stephen J.; Coulter, Douglas A. (2007): Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (51), S. 14012–14022. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4390-07.2007.

Patterson, Katelin P.; Baram, Tallie Z.; Shinnar, Shlomo (2014): Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11 (2), S. 242–250. DOI: 10.1007/s13311-014-0263-4.

Paxinos, George; Watson, Charles (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam, Boston: Academic Press/Elsevier. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10378802>.

Peterson, D. A.; Lucidi-Phillipi, C. A.; Eagle, K. L.; Gage, F. H. (1994): Perforant path damage results in progressive neuronal death and somal atrophy in layer II of entorhinal cortex and functional impairment with increasing postdamage age. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (11 Pt 2), S. 6872–6885.

Picot, Marie-Christine; Baldy-Moulinier, Michel; Daures, Jean-Pierre; Dujols, Pierre; Crespel, Arielle (2008): The prevalence of epilepsy and pharmacoresistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. In: *Epilepsia* 49 (7), S. 1230–1238. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01579.x.

Pilli, Jyotsna; Abbasi, Saad; Richardson, Max; Kumar, Sanjay S. (2012): Diversity and excitability of deep-layer entorhinal cortical neurons in a model of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurophysiol* 108 (6), S. 1724–1738. DOI: 10.1152/jn.00364.2012.

Pinel, J. P.; Rovner, L. I. (1978): Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. In: *Experimental neurology* 58 (2), S. 190–202.

Pitkanen, Asla; Immonen, Riikka (2014): Epilepsy related to traumatic brain injury. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11 (2), S. 286–296. DOI: 10.1007/s13311-014-0260-7.

Pitkanen, Asla; Immonen, Riikka J.; Grohn, Olli H. J.; Kharatishvili, Irina (2009): From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. In: *Epilepsia* 50 Suppl 2, S. 21–29. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.02007.x.

Pitkanen, Asla; Lukasiuk, Katarzyna (2011): Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. In: *The Lancet. Neurology* 10 (2), S. 173–186. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70310-0.

- Poduri, A.; Beason-Held, L. L.; Moss, M. B.; Rosene, D. L.; Hyman, B. T. (1995): CA3 neuronal degeneration follows chronic entorhinal cortex lesions. In: *Neuroscience letters* 197 (1), S. 1–4.
- Preusser, M.; Laggner, U.; Haberler, C.; Heinzl, H.; Budka, H.; Hainfellner, J. A. (2006): Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. In: *Histopathology* 48 (4), S. 438–444. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02359.x.
- Racine, R. J. (1972): Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. In: *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 32 (3), S. 281–294.
- Radzik, Iwona; Miziak, Barbara; Dudka, Jaroslaw; Chroscinska-Krawczyk, Magdalena; Czuczwar, Stanislaw J. (2015): Prospects of epileptogenesis prevention. In: *Pharmacological reports : PR* 67 (3), S. 663–668. DOI: 10.1016/j.pharep.2015.01.016.
- Ramón y Cajal, Santiago (1909): *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Paris: Maloine. Online verfügbar unter <https://archive.org/details/histologiedusyst01ram>.
- Ribak, C. E.; Khan, S. U. (1987): The effects of knife cuts of hippocampal pathways on epileptic activity in the seizure-sensitive gerbil. In: *Brain Res* 418 (1), S. 146–151.
- Rutecki, P. A.; Grossman, R. G.; Armstrong, D.; Irish-Loewen, S. (1989): Electrophysiological connections between the hippocampus and entorhinal cortex in patients with complex partial seizures. In: *Journal of neurosurgery* 70 (5), S. 667–675. DOI: 10.3171/jns.1989.70.5.0667.
- Sargolini, Francesca; Fyhn, Marianne; Hafting, Torkel; McNaughton, Bruce L.; Witter, Menno P.; Moser, May-Britt; Moser, Edvard I. (2006): Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. In: *Science* 312 (5774), S. 758–762. DOI: 10.1126/science.1125572.
- Savage, D. D.; Rigsbee, L. C.; McNamara, J. O. (1985): Knife cuts of entorhinal cortex: effects on development of amygdaloid kindling and seizure-induced decrease of muscarinic cholinergic receptors. In: *J Neurosci* 5 (2), S. 408–413.
- Schafer, Ruth; Dehn, Doris; Burbach, Guido J.; Deller, Thomas (2008): Differential regulation of chondroitin sulfate proteoglycan mRNAs in the denervated rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion. In: *Neuroscience letters* 439 (1), S. 61–65. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.04.098.
- Scharfman, H. E.; Goodman, J. H.; Du, F.; Schwarcz, R. (1998): Chronic changes in synaptic responses of entorhinal and hippocampal neurons after amino-oxyacetic acid (AOAA)-induced entorhinal cortical neuron loss. In: *J Neurophysiol* 80 (6), S. 3031–3046.
- Schmidt, Dieter; Loscher, Wolfgang (2005): Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. In: *Epilepsia* 46 (6), S. 858–877. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.54904.x.
- Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo; Voll, Markus; Wesker, Karl (2015): *Kopf, Hals und Neuroanatomie. 123 Tabellen. 4., überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart u.a.: Thieme (Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker).
- Semah, F.; Picot, M. C.; Adam, C.; Broglin, D.; Arzimanoglou, A.; Bazin, B. et al. (1998): Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? In: *Neurology* 51 (5), S. 1256–1262.

- Shao, Li-Rong; Dudek, F. Edward (2011): Repetitive perforant-path stimulation induces epileptiform bursts in minislices of dentate gyrus from rats with kainate-induced epilepsy. In: *Journal of neurophysiology* 105 (2), S. 522–527. DOI: 10.1152/jn.00456.2010.
- Sillanpaa, Matti; Shinnar, Shlomo (2010): Long-term mortality in childhood-onset epilepsy. In: *The New England journal of medicine* 363 (26), S. 2522–2529. DOI: 10.1056/NEJMoa0911610.
- Singh, Shatrunjai P.; He, Xiaoping; McNamara, James O.; Danzer, Steve C. (2013): Morphological changes among hippocampal dentate granule cells exposed to early kindling-epileptogenesis. In: *Hippocampus* 23 (12), S. 1–24. DOI: 10.1002/hipo.22169.
- Sloviter, R. S. (1987): Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. In: *Science (New York, N.Y.)* 235 (4784), S. 73–76.
- Sloviter, R. S. (1991): Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. In: *Hippocampus* 1 (1), S. 41–66. DOI: 10.1002/hipo.450010106.
- Sloviter, R. S.; Damiano, B. P. (1981): Sustained electrical stimulation of the perforant path duplicates kainate-induced electrophysiological effects and hippocampal damage in rats. In: *Neuroscience letters* 24 (3), S. 279–284.
- Sloviter, Robert S. (2009): Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? In: *Epilepsia* 50 Suppl 12, S. 11–13. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02363.x.
- Sloviter, Robert S.; Bumanglag, Argyle V.; Schwarcz, Robert; Frotscher, Michael (2012): Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. *BJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. In: Jeffrey L. Noebels, Massimo Avoli, Michael A. Rogawski, Richard W. Olsen und Antonio V. Delgado-Escueta (Hg.): *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4. Aufl. Bethesda (MD), S. 1–20.
- Sloviter, Robert S.; Zappone, Colin A.; Bumanglag, Argyle V.; Norwood, Braxton A.; Kudrimoti, Hemant (2007): On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 48 Suppl 8, S. 6–10.
- Sommer, Wilhelm (1880): Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. In: *Archiv f. Psychiatrie* 10 (3), S. 631–675. DOI: 10.1007/BF02224538.
- Staley, Kevin; Hellier, Jennifer L.; Dudek, F. Edward (2005): Do interictal spikes drive epileptogenesis? In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11 (4), S. 272–276. DOI: 10.1177/1073858405278239.
- Staley, Kevin J.; Dudek, F. Edward (2006): Interictal spikes and epileptogenesis. In: *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 6 (6), S. 199–202. DOI: 10.1111/j.1535-7511.2006.00145.x.
- Staley, Kevin J.; White, Andrew; Dudek, F. Edward (2011): Interictal spikes: harbingers or causes of epilepsy? In: *Neuroscience letters* 497 (3), S. 247–250. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.070.
- Steward, O.; Cotman, C. W.; Lynch, G. S. (1974): Growth of a new fiber projection in the brain of adult rats: Re-innervation of the dentate gyrus by the contralateral entorhinal cortex following ipsilateral entorhinal lesions. In: *Experimental brain research* 20 (1), S. 45–66.

- Steward, O.; Scoville, S. A. (1976): Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 169 (3), S. 347–370. DOI: 10.1002/cne.901690306.
- Stoop, R.; Pralong, E. (2000): Functional connections and epileptic spread between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala in a modified horizontal slice preparation of the rat brain. In: *The European journal of neuroscience* 12 (10), S. 3651–3663.
- Strine, Tara W.; Kobau, Rosemarie; Chapman, Daniel P.; Thurman, David J.; Price, Patricia; Balluz, Lina S. (2005): Psychological distress, comorbidities, and health behaviors among U.S. adults with seizures: results from the 2002 National Health Interview Survey. In: *Epilepsia* 46 (7), S. 1133–1139. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.01605.x.
- Sutula, Thomas P.; Dudek, F. Edward (2007): Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. In: *Progress in brain research* 163, S. 541–563. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63029-5.
- Swartzwelder, H. S.; Lewis, D. V.; Anderson, W. W.; Wilson, W. A. (1987): Seizure-like events in brain slices: suppression by interictal activity. In: *Brain research* 410 (2), S. 362–366.
- Tauboll, Erik; Sveberg, Line; Svalheim, Sigrid (2015): Interactions between hormones and epilepsy. In: *Seizure* 28, S. 3–11. DOI: 10.1016/j.seizure.2015.02.012.
- Tauck, D. L.; Nadler, J. V. (1985): Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5 (4), S. 1016–1022.
- Tellez-Zenteno, Jose F.; Hernandez-Ronquillo, Lizbeth (2012): A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsy research and treatment* 2012, S. 1–5. DOI: 10.1155/2012/630853.
- Toyoda, Izumi; Bower, Mark R.; Leyva, Fernando; Buckmaster, Paul S. (2013): Early activation of ventral hippocampus and subiculum during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (27), S. 11100–11115. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0472-13.2013.
- Toyoda, Izumi; Fujita, Satoshi; Thamattoor, Ajoy K.; Buckmaster, Paul S. (2015): Unit Activity of Hippocampal Interneurons before Spontaneous Seizures in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (16), S. 6600–6618. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4786-14.2015.
- Trinka, Eugen; Bauer, Gerhard; Oberaigner, Willi; Ndayisaba, Jean-Pierre; Seppi, Klaus; Granbichler, Claudia A. (2013): Cause-specific mortality among patients with epilepsy: results from a 30-year cohort study. In: *Epilepsia* 54 (3), S. 495–501. DOI: 10.1111/epi.12014.
- Trinka, Eugen; Brigo, Francesco (2014): Antiepileptogenesis in humans: disappointing clinical evidence and ways to move forward. In: *Current opinion in neurology* 27 (2), S. 227–235. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000067.
- Trommer, B. L.; Pasternak, J. F. (1990): NMDA receptor antagonists inhibit kindling epileptogenesis and seizure expression in developing rats. In: *Brain research. Developmental brain research* 53 (2), S. 248–252.
- Turski, W. A.; Cavalheiro, E. A.; Schwarz, M.; Czuczwar, S. J.; Kleinrok, Z.; Turski, L. (1983): Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. In: *Behavioural brain research* 9 (3), S. 315–335.

- Twele, Friederike; Bankstahl, Marion; Klein, Sabine; Romermann, Kerstin; Loscher, Wolfgang (2015): The AMPA receptor antagonist NBQX exerts anti-seizure but not antiepileptogenic effects in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. In: *Neuropharmacology* 95, S. 234–242. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.03.014.
- van Paesschen, W.; Connelly, A.; King, M. D.; Jackson, G. D.; Duncan, J. S. (1997): The spectrum of hippocampal sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study. In: *Annals of neurology* 41 (1), S. 41–51. DOI: 10.1002/ana.410410109.
- van Strien, N. M.; Cappaert, N. L. M.; Witter, M. P. (2009): The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (4), S. 272–282. DOI: 10.1038/nrn2614.
- Vermoesen, Katia; Smolders, Ilse; Massie, Ann; Michotte, Yvette; Clinckers, Ralph (2010): The control of kainic acid-induced status epilepticus. In: *Epilepsy research* 90 (1-2), S. 164–166. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2010.04.001.
- Verrotti, Alberto; Carrozzino, Danilo; Milioni, Maddalena; Minna, Maria; Fulcheri, Mario (2014): Epilepsy and its main psychiatric comorbidities in adults and children. In: *Journal of the neurological sciences* 343 (1-2), S. 23–29. DOI: 10.1016/j.jns.2014.05.043.
- Vespa, P. M.; McArthur, D. L.; Xu, Y.; Eliseo, M.; Etchepare, M.; Dinov, I. et al. (2010): Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy. In: *Neurology* 75 (9), S. 792–798. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181f07334.
- Vezzani, Annamaria; French, Jacqueline; Bartfai, Tamas; Baram, Tallie Z. (2011): The role of inflammation in epilepsy. In: *Nature reviews. Neurology* 7 (1), S. 31–40. DOI: 10.1038/nrneurol.2010.178.
- Vieira, A. S.; Matos, A. H. de; do Canto, A. M.; Rocha, C. S.; Carvalho, B. S.; Pascoal, V. D. B. et al. (2016): RNA sequencing reveals region-specific molecular mechanisms associated with epileptogenesis in a model of classical hippocampal sclerosis. In: *Scientific reports* 6, S. 22416. DOI: 10.1038/srep22416.
- Vismer, Marta S.; Forcelli, Patrick A.; Skopin, Mark D.; Gale, Karen; Koubeissi, Mohamad Z. (2015): The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. In: *Front Neural Circuits* 9, S. 1–14. DOI: 10.3389/fncir.2015.00027.
- Waller, A. (1850): Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140 (0), S. 423–429. DOI: 10.1098/rstl.1850.0021.
- Wang, Jack T.; Medress, Zachary A.; Barres, Ben A. (2012): Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. In: *The Journal of cell biology* 196 (1), S. 7–18. DOI: 10.1083/jcb.201108111.
- White, Andrew; Williams, Philip A.; Hellier, Jennifer L.; Clark, Suzanne; Dudek, F. Edward; Staley, Kevin J. (2010): EEG spike activity precedes epilepsy after kainate-induced status epilepticus. In: *Epilepsia* 51 (3), S. 371–383. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02339.x.
- WHO (2015): World Health Organization (WHO). “Epilepsy”. WHO Factsheet, May 2015: number 999;. World Health Organization. Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>, zuletzt geprüft am 27.10.2015.
- Wiebe, S.; Blume, W. T.; Girvin, J. P.; Eliasziw, M. (2001): A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. In: *The New England journal of medicine* 345 (5), S. 311–318. DOI: 10.1056/NEJM200108023450501.

- Wieser, Heinz-Gregor (2004): ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. In: *Epilepsia* 45 (6), S. 695–714. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x.
- Will, Johanna L.; Eckart, Moritz T.; Rosenow, Felix; Bauer, Sebastian; Oertel, Wolfgang H.; Schwarting, Rainer K. W.; Norwood, Braxton A. (2013): Enhanced sequential reaction time task performance in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy with classic hippocampal sclerosis. In: *Behavioural brain research* 247, S. 65–72. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.03.019.
- Williams, Philip A.; White, Andrew M.; Clark, Suzanne; Ferraro, Damien J.; Swiercz, Walde-
mar; Staley, Kevin J.; Dudek, F. Edward (2009a): Development of spontaneous recurrent sei-
zures after kainate-induced status epilepticus. In: *The Journal of neuroscience : the official
journal of the Society for Neuroscience* 29 (7), S. 2103–2112. DOI: 10.1523/JNEURO-
SCI.0980-08.2009.
- Williams, Philip A.; White, Andrew M.; Clark, Suzanne; Ferraro, Damien J.; Swiercz, Walde-
mar; Staley, Kevin J.; Dudek, F. Edward (2009b): Development of spontaneous recurrent sei-
zures after kainate-induced status epilepticus. In: *The Journal of neuroscience : the official
journal of the Society for Neuroscience* 29 (7), S. 2103–2112. DOI: 10.1523/JNEURO-
SCI.0980-08.2009.
- Witter, Menno P.; Canto, Cathrin B.; Couey, Jonathan J.; Koganezawa, Noriko; O'Reilly,
Kally C. (2014): Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. In: *Philosophical
transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369 (1635), S. 1–7.
DOI: 10.1098/rstb.2012.0515.
- Woodhams, P. L.; Atkinson, D. J. (1996): Entorhinal axons perforate hippocampal field CA3
in organotypic slice culture. In: *Brain research. Developmental brain research* 95 (1), S. 144–
147.
- Xu, Dan; Miller, Stephen D.; Koh, Sookyong (2013): Immune mechanisms in epileptogene-
sis. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 195. DOI: 10.3389/fncel.2013.00195.
- Zhao, Mingrui; Alleva, Rose; Ma, Hongtao; Daniel, Andy G. S.; Schwartz, Theodore H.
(2015): Optogenetic tools for modulating and probing the epileptic network. In: *Epilepsy rese-
arch* 116, S. 15–26. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2015.06.010.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

ABM-Komplexe = Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplexe

A/d = Anfälle pro Tag (day)

a/p = anterior / posterior

CA= Cornu ammonis

d/v = dorsal / ventral

EEG = Elektroenzephalographie

EIL = Epilepsie induzierenden Läsion

EPSP = exzitatorisches postsynaptisches Potential

FR = fast ripples (aus dem Englischen)

GD = Gyrus dentatus

HFO = high-frequency-oscillations (aus dem Englischen)

HS = Hippocampusklerose

Hz = Herz

ICB = intracerebrale Blutung

ILAE = International League Against Epilepsy (aus dem Englischen)

i.p. = intraperitoneal

IPI = initial precipitating injurie (aus dem Englischen)

IPSP = inhibitorisches postsynaptisches Potential

KG = Körpergewicht

LEC = lateraler entorhinaler Cortex

MEC = medialer entorhinaler Cortex

m/l = medial / lateral

MRT = Magnetresonanztomographie

NeuN = Neuronal Nuclei

N/mm² = Neuronen pro Quadratmillimeter

NKTPS-Tiermodell= nicht-konvulsives-Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell

PE = pharmakoresistente Epilepsie

p.i. = per inhalationem

Post-SE-Tiermodell = Post-Status-epilepticus-Tiermodell

PP = Phosphatpuffer

PS = population spike (aus dem Englischen)

RER = raues endoplasmatisches Retikulum

s.c = subkutan (aus dem Lateinischen: Sub cutis)

SE = Status epilepticus

SHT = Schädelhirntraumata

SUDEP = sudden unexpected death of epilepsy patients (aus dem Englischen)

TLE = Temporallappenepilepsie

TP = Tractus perforans

TPD = Tractus perforans Durchtrennung

TPD-Gruppe = Tractus-perforans-Durchtrennungs-Gruppe

TPS = Tractus perforans Stimulation

TPS-Tiermodell = klassisches Tractus-perforans-Stimulations-Tiermodell

V = Volt

WHO = World Health Organisation (aus dem Englischen)

ZNS = Zentralnervensystem

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Hippocampus und der parahippocampalen Region.	- 13 -
Abbildung 2: Das klassische Hippocampal-Parahippocampale-Netzwerk	- 14 -
Abbildung 3: Verlauf des Tractus perforans.	- 15 -
Abbildung 4: Spontane Körnerzellpotenziale	- 24 -
Abbildung 5: Zeitleiste des Versuchsablaufs	- 27 -
Abbildung 6: Im Stereotaxieramen befestigtes Versuchstier.	- 29 -
Abbildung 7: Freipräparierte Schädeldecke	- 29 -
Abbildung 8: Im Versuch verwendete Elektroden und Befestigungsschrauben.	- 30 -
Abbildung 9: Elektrodenimplantation.	- 31 -
Abbildung 10: EPSP mit PS	- 32 -
Abbildung 11: In der Körnerzellschicht evoziertes extrazelluläres Potential.	- 32 -
Abbildung 12: „Elektrodenkappe“	- 33 -
Abbildung 13: Ausschnitt der Körnerzellaktivität während der 30 min Stimulation.	- 34 -
Abbildung 14: Während der 30 Minuten Stimulation aufgezeichnete Körnerzellaktivität.	- 35 -
Abbildung 15: Schnittführung bei der TPD.	- 38 -
Abbildung 16: Beobachtung eines Versuchstieres.	- 39 -
Abbildung 17: Nissel gefärbter Hippocampus.	- 42 -
Abbildung 18: Ablauf der immunhistochemischen Färbung mit NeuN	- 44 -
Abbildung 19: Skalierungsgitter	- 45 -
Abbildung 20: Ermittlung der Hippocampusfläche	- 45 -
Abbildung 21: Umrandung der Teilgebiete des Hippocampus	- 47 -
Abbildung 22: Kalibrierungskästchen (2)	- 47 -
Abbildung 23: Neuronenzählung	- 48 -
Abbildung 24: Versuchsaufbau	- 53 -
Abbildung 25: Elektrophysiologische Verifizierung der TPD	- 55 -
Abbildung 26: Histologische Verifizierung der TPD	- 56 -
Abbildung 27: Beobachtungszeitraum	- 57 -
Abbildung 28: Latenzzeit	- 59 -
Abbildung 29: Ermittlung der Anfallslänge	- 60 -
Abbildung 30: Anfallslänge	- 61 -
Abbildung 31: Körnerzellpotentiale während epileptischer Anfälle.....	- 62 -
Abbildung 32: Video- und EEG-Daten eines epileptischen Anfalls	- 64 -
Abbildung 33: Ablauf der histologischen Auswertung	- 66 -
Abbildung 34: Hippocampusfläche in mm ²	- 67 -
Abbildung 35: Versuchstier mit ausgeprägter HS und Versuchstier ohne HS	- 69 -
Abbildung 36: Hippocampusfläche von Tieren mit/ohne HS	- 70 -
Abbildung 37: Neuronenzahl	- 71 -
Abbildung 38: Relative Neuronenzahl	- 72 -
Abbildung 39: Chronische histologische Veränderungen im NKTPS-Tiermodell.....	- 78 -

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der elektrophysiologischen und histologischen Veränderungen des EC mit denen des Hippocampus.	- 17 -
Tabelle 2: Die fünf Klassen der Racine-Scala (Racine 1972).....	- 41 -
Tabelle 3: Verwendete Geräte	- 51 -
Tabelle 4: Verwendete Substanzen	- 52 -
Tabelle 5: Verwendete Software	- 52 -
Tabelle 6: Beobachtete Versuchstiere ohne epileptische Anfälle	- 58 -
Tabelle 7: Latenzzeit in Tagen (d).	- 59 -
Tabelle 8: Länge und Schwere der epileptischen Anfälle	- 61 -
Tabelle 9: Anfallsfrequenz	- 65 -
Tabelle 10: Durchschnittliche Fläche des Hippocampus	- 68 -
Tabelle 11: Durchschnittliche Neuronenzahl	- 70 -
Tabelle 12: Durchschnittliche und relative Neuronenzahl	- 72 -

10.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren:

Adamkiewicz, Bartsch, Baum, Baumann, S. Becker, K. Becker, Best, Bien, Bohlander, Brehm, Cetin, Czubayko, Dannlowski, Daut, Depboylu, Dodel, Donner-Banzoff, Efe, Ellenrieder, Farouk El-Zayat, Engenhardt-Cabillic, Eggert, Exner, Fendrich, Feuser, Figiel, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grgic, Grundmann, Grzeschik, Hertl, Heverhagen, Hilt, Hirche, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jerrentrup, Kann, Kill, Kircher, Klose, Kluge, Klein, Knipper, Knake, König, Konrad, Koolmann, Kruse, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maisner, Moll, Mueller, Müller, Murck, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Riße, Roelcke, Rosenow, Ruchholtz, H. Schäfer, J. Schäfer, Schmidt, J. Schneider, S.Schneider, Schofer, Schulze, Schwarting, Seifert, Seitz, Sekundo, Steiniger, Strick, Strzelczyk, Tackenberg, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wrocklage, Wulf

Meine akademischen Lehrer an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster waren:

Bahde, Dittrich, Duning, Dziewas, Grauer, Herbort, Langer, Laukötter, Melzer, Minnerup, Meuth, Ochmann, Palmes, Raschke, Rijcken, Schilling, Senninger, Stange, Vowinkel, Warnicke, Wiendl

10.5 Danksagung

Ich Bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Felix Rosenow für die vertrauensvolle Annahme und Betreuung als Doktorand. Durch die Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Felix Rosenow war es mir möglich, die vorliegende Arbeit in größtmöglicher Freiheit durchzuführen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Braxton Norwood für die Einführung in das von ihm entwickelte Tiermodell der Temporallappenepilepsie, aber auch für die Unterstützung, Diskussion und Zusammenarbeit während der Arbeit im Labor und bei der Veröffentlichung unseres gemeinsamen Manuskriptes.

Herrn Dr. med Sebastian Bauer danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen und für die Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor.

Bei Herrn Valentin Neubert bedanke ich mich für die Möglichkeit, Fotos von seinem momentanen Forschungsprojekt zur Veranschaulichung des NKTPS-Tiermodelles für diese Arbeit anzufertigen und zu verwenden.

Den Tierpflegern der Tierhaltungs-Containeranlagen des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Arbeit im Labor.

Für die Durchsicht meines Manuskriptes danke ich Herrn Prof. Felix Rosenow sowie Alissa Schreiber.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Freundin für die Unterstützung während des Studiums und während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift.

10.6 Puplicationsliste

Meyer, Martin; Kienzler-Norwood, Friederike; Bauer, Sebastian; Rosenow, Felix; Norwood, Braxton A. (2016): Removing entorhinal cortex input to the dentate gyrus does not impede low frequency oscillations, an EEG-biomarker of hippocampal epileptogenesis. In: *Scientific reports* 6, S. 25660. DOI: 10.1038/srep25660.